

Die Virulenzbestimmung von *S. aureus* Keimen von  
Patienten mit Implantat-assoziierten Knocheninfektionen  
mittels *in-vivo*-, *in-vitro*- und Biofilmuntersuchungen im  
Vergleich zum klinischen Verlauf

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Koettnitz, Julian  
aus Weingarten  
Giessen 2018

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie Labor für Experimentelle  
Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Giessen unter der Leitung von Univ.-Prof.  
Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß

Aus dem Institut der Medizinischen Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Giessen  
unter der Leitung von Prof. Trinad Chakraborty

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Volker Alt

Gutachter: Prof. Dr. Trinad Chakraborty

Tag der Disputation: 14.05.2019

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>4</b>
1.1 Staphylokokken .....	4
1.1.1 Virulenzfaktoren .....	7
1.1.2 Biofilmbildung .....	11
1.2 Implantat-assoziierte Infektionen .....	15
1.2.1 Relevanz .....	15
1.2.2 Pathogenese .....	16
1.2.3 Klinik .....	17
1.2.4 Diagnostik .....	18
1.2.5 Therapie .....	22
1.3 Zielstellung der Dissertation .....	24
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
2.1 Material .....	25
2.1.1 Geräte und Software .....	25
2.1.2 Instrumentarium .....	26
2.1.3 Chemikalien .....	27
2.1.4 Medien & Puffer .....	28
2.1.5 Primer .....	28
2.1.6 Keime .....	28
2.1.7 Versuchstiere/-zellen .....	30
2.2 Methoden .....	30
2.2.1 Wachstumskurven der <i>S. aureus</i> Stämme .....	30
2.2.2 Infektionsversuch mit <i>Galleria mellonella</i> .....	31
2.2.3 Osteoblasteninvasionsmodell .....	32
2.2.4 MTT Assay .....	33
2.2.5 Biofilm-Assay .....	33
2.2.6 DNA Isolation .....	34
2.2.7 Realtime PCR .....	34
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>36</b>
3.1 Wachstumskurven .....	36
3.2 Infektionsversuch mit <i>Galleria mellonella</i> .....	37
3.3 Osteoblasteninvasionsmodell .....	39
3.3.1 Invasivität 1h post infectionem .....	39
3.3.2 Intrazelluläres Wachstum von <i>S. aureus</i> in Osteoblasten .....	39
3.3.3 MTT Viabilität .....	43
3.4 Biofilm-Assay .....	44
3.5 Realtime PCR .....	46
3.6 Untersuchungsergebnisse und klinischer Verlauf .....	49
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>51</b>
4.1 Infektionsmodell <i>Galleria mellonella</i> .....	51
4.2 Osteoblasteninvasionsmodell .....	56
4.3 Biofilm-Assay .....	61

4.4	Vergleich Studienergebnisse mit klinischem Verlauf .....	65
4.5	Korrelation der Ergebnisse, Limitationen und Ausblick .....	66
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>Abstract / Summery .....</b>	<b>71</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>72</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>84</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>85</b>
	<b>Publikationsverzeichnis .....</b>	<b>87</b>
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>88</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>89</b>



## 1 Einleitung

„Not too much metal to the bone!“ Diese Aussage Ende des 19. Jahrhunderts, Anfang des 20. Jahrhunderts ist als Leitsatz zu verstehen. Nachdem Dr. Carl Hansmann in seiner Veröffentlichung „Eine neue Methode der Fixierung der Fragmente bei komplizierten Frakturen“ 1886 die erste Form der Plattenosteosynthese mit nach außen ragenden Schrauben vorstellte, folgten die Komplikationen der Implantatinfektion und Osteomyelitis prompt. Erst durch weitere Entwicklungen, u.a. durch die Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen (AO) ab Mitte der 1950er Jahre, konnte das Infektionsrisiko nach Osteosynthesen deutlich verringert und zur klinischen Reife entwickelt werden (HANSMANN C 1886; MÜLLER ME ET AL. 1963; LUHR, H-G 2000).

Zeigen sich Unregelmäßigkeiten in der operierten Region, wie persistierende Wundsekretionen, Rötungen, Hautdehiszenzen und trotz mechanischer Stabilität der Osteosynthese eine Pseudarthrose, dann sollte bis zur Darlegung des Gegenteils von einer implantatassoziierten Knocheninfektion ausgegangen werden. Mit inbegriffen in die Diagnostik ist die Anamnese, die radiologische Diagnostik, die Klinik des Patienten, die Histologie und Mikrobiologie (RENZ N ET AL. 2017).

Generell wird zwischen einer akuten und einer chronischen implantatassoziierten Infektion unterschieden. Die Diagnose der akuten Implantatinfektion kann durch die unmittelbare klinische Symptomatik gestellt werden. Systemische Entzündungszeichen, Schmerzen, Schwellung und Rötung bis hin zu septischen Symptomen in Verbindung mit laborchemischen Entzündungszeichen und bildgebender Diagnostik ermöglichen die rasche Diagnose. Hoch virulente Erreger sind hierfür verantwortlich. Anders verhält es sich mit der chronischen und verzögerten Infektion. Die Symptome können sehr milde ausfallen und die Entzündungssymptomatik kann oftmals gänzlich fehlen (BARRETT L, ATKINS B 2014). In beiden Fällen sind *Staphylococcus aureus* Stämme oftmals die auslösenden Krankheitserreger.

### 1.1 Staphylokokken

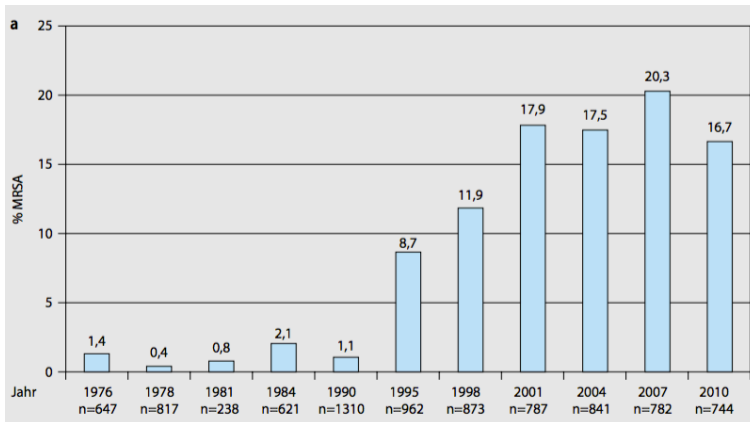
Die Gram-positiven Staphylokokken, welche durch Ihre Kugelform und die Eigenschaft der Haufenbildung auffallen, werden in zwei unterschiedliche Kategorien eingeteilt.

Zum einen gibt es die Koagulase-negativen Staphylokokken, welche durch die bspw. *S. epidermidis*-Domäne mit *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. capitis* und die *S. saprophyticus*-Domäne gekennzeichnet ist. Zum anderen gibt es die Koagulase-positiven Staphylokokken, welche bspw. durch *S. aureus* repräsentiert werden HAHN H (1991).

Das Gram-positive, koagulase-positive Bakterium *Staphylococcus aureus* ist kugelförmig aufgebaut und in eng beieinanderliegenden, traubenförmigen Haufen angeordnet. Der Durchmesser des Bakteriums variiert zwischen 0,5- 1,5 µm. Das Bakterium gilt als nicht Sporen bildend und nicht aktiv beweglich. *S. aureus* ist fakultativ anaerob und wächst sowohl über aerobe Atmung als auch über den Gärungsprozess. Staphylokokken besiedeln als Teil der normalen Mikrobiota die humane Haut, Schleimhaut und Nasenhöhlen. *Staphylococcus aureus* kann ein weites Spektrum an milden superfiziellen Hautinfektionen bis zu lebensgefährlichen Septitiden, Endokarditiden und Pneumonien verursachen (HAUCK C R ET AL. 2006, ARICOLA C R ET AL. 2011, BOYLE-VAVRA S ET AL. 2006, HARRIS L G ET AL. 2006, SAADATIAN-ELAHI M ET AL. 2008).

*Staphylococcus aureus* wird im klinischen Alltag in zwei Gruppen eingeteilt. Zum einen gibt es die methicillin-sensiblen Staphylokokken (MSSA) und zum anderen die methicillin-resistenten Staphylokokken (MRSA). Beide Staphylokokkenarten unterscheiden sich prinzipiell in Bezug auf die Behandelbarkeit durch Antibiotika. Mit der Entdeckung der Spezies *Staphylococcus aureus* mit seiner typisch goldgelben Farbe um 1880 wurde die virulenteste Staphylokokkenart gefunden. Bis zur Entwicklung des ersten Penicillin-Antibiotikums, auch Beta-Laktam-Antibiotika genannt, in den 1940er Jahren, war eine effiziente Therapie der Staphylokokken nicht möglich. Doch schon ungefähr zwei Jahre später wurde das erste Penicillin-resistente Isolat in einem Krankenhaus entdeckt. Mit der Einführung von Methicillin 1959 wurde das erste Penicillinase-feste Penicillin entwickelt. Der Beta-Laktamring konnte durch die bakteriellen Penicillinasen nur ineffizient attackiert werden. Doch 1961 schon wurden HA-MRSA (hospital-aquired MRSA) Stämme entdeckt. Nach kontinuierlicher langsamer Verbreitung des HA-MRSA kam es in den späten 1990er Jahren zu einem rasanten Anstieg der MRSA Raten. Vor allem wurde dieser Anstieg durch Staphylokokkenarten außerhalb von Krankenhäusern verursacht. Diese sogenannten CA-MRSA (community-aquired MRSA) Infektionen lösten zum größten Teil die MSSA Infektionen ab. Eine Resistenzstudie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft zeigt den Anteil von MRSA Stämmen bei *S. aureus*-Infektionen in Krankenhäusern. In dieser

Längsschnittstudie werden seit den 1970er Jahren die Resistenzhäufigkeiten bei wichtigen Erregern wie *S. aureus* von 30 Laboren aus Deutschland, Österreich und Schweiz ausgewertet. Aus der folgenden Abbildung (Abb. 1) wird ersichtlich das eine kontinuierliche Steigerung der Infektionsraten mit HA-MRSA-Beteiligung vorliegt.



**Abbildung 1: Anteil der MRSA an allen untersuchten *S. aureus*; Daten aus den Resistenzstudien der Paul-Ehrlich-Gesellschaft;**

MRSA = methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*, n=Anzahl der Isolate (Quelle: LAYER F ET AL. 2012)

Die wachsende Anzahl an CA-MRSA Trägern wird durch eine Studie von KLEIN ET AL. (2009) mit mehr als 50.000 Isolate von über 300 mikrobiologischen Laboren dargelegt. Bei den Isolaten handelt es sich um Proben ambulant behandelter Patienten zwischen 1999-2006. Deutlich ist auch hier eine kontinuierliche prozentuale Steigerung der CA-MRSA Träger in der Gesellschaft zu erkennen.

**Tabelle 1 Frequenz von MRSA in Krankenhäusern der USA;**

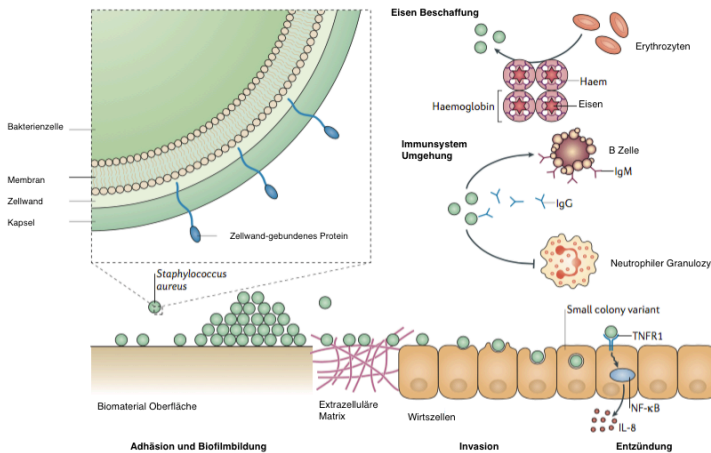
(modifiziert nach: KLEIN ET AL. 2009)

Tabelle. Frequenz von MRSA in Krankenhäusern, USA				1999–2006*				
Einheit	% Patienten (95% Konfidenzintervall)							
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006†
ambulante Patienten								
Alle MRSA	26.8 (26.3–27.3)	29.4 (29.0–29.9)	33.4 (33.0–33.9)	35.7 (35.3–36.2)	40.7 (40.2–41.2)	47.7 (47.3–48.1)	52.7 (52.3–53.1)	52.4 (52.0–52.9)
HA-MRSA	23.2 (23.0–23.5)	25.1 (24.9–25.4)	28.2 (28.0–28.5)	28.4 (28.2–28.7)	29.3 (29.0–29.5)	28.4 (28.2–28.7)	24.1 (23.8–24.3)	24.2 (24.0–24.5)
Blut	2.7	2.8	4.0	3.7	3.1	2.8	2.1	1.9
Lunge	4.7	5.3	6.5	5.5	5.4	4.2	3.5	2.9
Haut	9.3	10.6	10.1	11.6	13.8	15.5	14.2	15.5
andere Quelle	6.4	6.5	7.6	7.7	7.0	6.0	4.2	4.0
CA-MRSA	3.6 (3.5–3.7)	4.3 (4.2–4.4)	5.2 (5.1–5.4)	7.3 (7.1–7.5)	11.4 (11.3–11.6)	19.3 (19.1–19.5)	28.7 (28.4–28.9)	28.2 (28.0–28.5)
Blut	0.3	0.3	0.6	0.7	0.8	0.8	0.9	0.8
Lunge	0.4	0.5	0.9	0.9	0.7	0.6	0.8	0.7
Haut	2.3	3.0	2.9	4.8	9.0	16.6	25.3	25.4
andere Quelle	0.5	0.5	0.8	0.9	1.0	1.3	1.6	1.4

### 1.1.1 Virulenzfaktoren

*S. aureus* besitzt eine große Bandbreite an Virulenzfaktoren. Die Eigenschaften der Virulenzfaktoren bestehen in der Kolonialisierung, dem Entkommen des Immunsystems und dem Akquirieren von Nährstoffen. Diese Auswirkungen können zu leichten bis schwerwiegenden Erkrankungen und Infektionen führen.

Besonders zu betrachten sind hier die mit der Zellwand verbundenen Proteine (CWA = cell wall-anchored), welche eine nicht-pathogene und pathogene Besiedelung ermöglichen (LACEY ET AL. 2016). Die CWA Proteine können in vier unterschiedliche Gruppen, die Adhäsine, die am Eisentransporter liegenden Proteine (NEAT motif family = near iron transporter), das Protein A und die G5-E Wiederholungsproteine (G5-E repeat family), eingeteilt werden. Unter dem Zusammenspiel dieser Gruppen wird die Phagozytose des Bakteriums im Wirt verhindert und das Überleben gesichert. Proteine der NEAT motif Familie benötigt das Bakterium, um das überlebenswichtige Eisen extrazellulär zu akquirieren. Hierbei sind die Eisen-regulierenden Oberflächenproteine (Isd = iron-regulated surface protein) ein wichtiger Faktor. Den Erythrozyten wird das Hämoglobin entzogen und über die Isd-Proteine in das Zellinnere verlagert. Ein weiterer Virulenzfaktor, das Protein A verhindert die Opsonierung und Phagozytose des Bakteriums. Die Fc Region des IgG, welche zur Aktivierung der klassischen Komplement-Kaskade benötigt wird, bindet das Protein A an der bakteriellen Zellwand und führt so zu einem Funktionsverlust. Zusätzlich löst die Bindung von *S. aureus* an den TNF1-Rezeptor eine Protein A gesteuerte Synthese von Cytokinen wie IL 6 (Interleukin 6) oder IL8 (Interleukin 8) aus, was zu Entzündungsreaktionen führt (FOSTER ET AL. 2014; ARICOLA ET AL. 2011) (ABBILDUNG 2).



**Abbildung 2: Funktion der cell-wall-anchored (CWA)-Proteine von *S. aureus*;**

Der Zellwand-gebundene Eisen-regulierende Oberflächenfaktor bindet Hämoglobin, entnimmt und transportiert Häm durch die Zellwand und Membran in das Zytoplasma, wo es zur Eisenfreisetzung kommt. Protein A funktioniert als Superantigen für B-Lymphozyten und stört die adaptive Immunantwort und das immunologische Gedächtnis. Durch Bindung von Immunglobulinproteinen und anderen Plasmaproteinen, Reduzierung der Anzahl von neutrophilen Rezeptoren für das Komplement C3b und die Inhibition von oxidativer Burst wird die Phagozytose über Neutrophile gehemmt. Zellwand-gebundene Proteine fordern die Anheftung des Keimes an Biomaterialien, Wirtszellen und die Akkumulation zu einem Biofilm. Weiterhin agieren die CWA Proteine mit Integrinen und fördern die Invasion in die Wirtszellen. Intrazellulär können die Bakterien entweder Apoptose oder Nekrose induzieren. Darüber hinaus können die Keime auch in einen fast inaktiven small-colony-variant Status wechseln. Durch Bindung von TNFR1 der wirtseigenen Epithelzellen löst Protein A eine Synthese von Cytokinen aus (bsp. IL6), was zu einer zerstörerischen Entzündung führt. IgG = Immunglobulin G, IgM = Immunglobulin M, TNFR1 = Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1, NFκB = Nuklearer Faktor kappa B, IL8 = Interleukin 8; (modifiziert nach FOSTER T J ET AL. 2014)

Am häufigsten in der Peptidoglykanschicht, als Untergruppe der CWA-Proteine, sind die Adhäsine vertreten. Diese 21-24 Proteine werden allgemein auch als mikrobielle Oberflächenbestandteile erkennende adhäsive Matrixmoleküle (MSCRAMM = microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules) bezeichnet (HAMMER ET AL. 2011; FOSTER ET AL. 2014; WEIDENMAIER ET AL. 2008; SCHADE ET AL. 2016). Die Funktion der MSCRAMM besteht vor allem in der bakteriellen Adhäsion an extrazelluläre Matrixmoleküle (EZM) des Wirtes und damit einhergehend in der Kolonisation von Gewebeoberflächen. Die MSCRAMM Proteine besitzen hoch-konservierte Aminosäure-Sequenzen, wodurch sie sich im Aufbau kaum unterschieden und strukturelle Ähnlichkeiten zeigen. Der Aufbau ist durch eine N-terminale Liganden-

binde Domäne, eine Zellmembran-umspannende Domäne und einer C-terminalen LPXTG Domäne gekennzeichnet. Letztere Domäne dient zur Zellwandbindung (MCCARTHY ET AL. 2015; ARICOLA ET AL. 2011). Mehrere Adhäsine können einen Wirtsliganden binden, aber auch ein adhäsives Protein kann mehrere Wirtsliganden binden (CAMPOCCIA ET AL. 2009). Wichtige Vertreter der Adhäsine sind die freien Koagulasen A und B (ClfA + B = clumping factor A + B), die Serine-aspartat repeat proteins C,D,E (SdrC,D,E, bone sialoprotein-binding protein (Bbp), die Fibronektin-Bindungsproteine A und B (FnBPA + B = Fibronektin-binding proteins A + B) und das Kollagen Adhäsin (Cna = collagen adhesin) (JOHANNESSEN ET AL. 2012; FOSTER ET AL. 2014; CORRIGAN ET AL. 2009). Betrachtet man die Invasionsfähigkeit von *Staphylococcus aureus*, so müssen die Fibronektin-Bindungsproteine erwähnt werden. Die Gene *fnBP A* und *fnBP B* sind eng zusammengehörige Gene. Die kodierten Proteine FnBP A und FnBP B sind essentiell für die Invasivität des Bakteriums gegenüber den Wirtszellen. Dass *Staphylococcus aureus* Stämme ohne *fnBP A* und *B* in Versuchen nur beschränkt und erschwert invasiv waren, unterstützt diese Aussage. Die Verbindung des Bakteriums mit den Wirtszellen wird durch Fibronektin (Fn) gewährleistet. Das Wirtsprotein bildet ein Zwischenstück mit dem FnBP des *S. aureus* und dem Integrin  $\alpha_5\beta_1$  des Wirtes (HEILMANN 2011; HAUCK ET AL. 2006). Durch FnBP kann eine Verbindung des Bakteriums mit der EZM des Wirtes, Körperflüssigkeiten, Prothesenflächen und Plastikoberflächen, welche mit Fibrinogen oder Fibronektin beschichtet sind, geschaffen. Nichtsdestotrotz kann eine Infektion und Invasion durch *S. aureus* nicht ohne weitere Adhäsine stattfinden. Cna und Sdr Proteine, zu denen das Bbp gehört, sind maßgeblich an orthopädischen Implantat-assoziierten Infektionen, Osteomyelitiden und septischen Arthritiden beteiligt. Als wichtige Brückenproteine für *S. aureus* in diesen Fällen sind das Bone Sialoprotein der EZM und das Kollagen I zu nennen. Kollagen I macht den Hauptteil der extrazellulären Knochenmatrixproteine aus. In mineralisiertem Bindegewebe ist zusätzlich das Bone Sialoprotein in hohem Ausmaß vorhanden, da es 8 - 10 % der nicht-kollagenen Proteine in der Knochengrundmasse ausmacht (JOSSE ET AL. 2015; CAMPOCCIA ET AL. 2009; SCHMELTZER 2000). Das Cna Protein des *S. aureus* bindet das Kollagen aus der EZM, wodurch u.a. die Invasion vermittelt wird. Des Weiteren ist Cna an den über die Blutgefäße herangetragenen Knocheninfektionen beteiligt und wird am stärksten exprimiert, wenn sich *S. aureus* in seiner exponentiellen Phase befindet. Bei Knorpelinfektionen und Implantat-assoziierten Infektionen ist Cna ein wichtiger Faktor. In europäischen Isolaten konnte eine Verbreitung des Cna-Proteins von 38-56% gefunden werden. Diese Keime standen unmittelbar im Zusammenhang mit Prothesen-

oder Knocheninfektionen (JOSSE ET AL. 2015; CAMPOCCIA 2009; CUNNINGHAM ET AL. 1996). Weitere wichtige Virulenzfaktoren der Staphylokokken sind die Hämolsine. Die Hämolsine  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  sind hierbei die bekanntesten Vertreter. Die Möglichkeit Poren in Membranen zu bilden, ist ein Faktor, welcher eine Entzündung durch *S. aureus* entstehen lässt. Weiterhin kann *S. aureus* durch bspw.  $\alpha$ -Hämolysin Prozesse mit Cytokinen einleiten, welche letztendlich zu einer Nekrose der Zellen führen kann. Dieser Vorgang kann durch eine Triggerung des NLRP3-Inflammasom (nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing proteins) ausgelöst werden. Zudem können durch Hämolsine auch Apoptose-getriggerte Zellauflösungen verursacht werden. (FRAUNHOLZ M, SINHA B 2012; CRAVEN RR ET AL. 2009)

Eine zusätzliche Strategie des *S. aureus* besteht in der Internalisation des Keimes in die Wirtszelle. Dieser Prozess funktioniert über endozytische Aufnahme. Hierbei sind auch die schon erwähnten MSCRAMMs beteiligt. Darüber hinaus kann *S. aureus* dem Phagosom entkommen, sich in der Zelle vermehren, und durch Apoptose der Zelle weiterverbreiten (BAYLES ET AL. 1998; JOHANNESSEN ET AL. 2012). AGERER ET AL. 2005 zeigten, dass *S. aureus* über einen Integrin-vermittelten Prozess in Verbindung mit der Hochregulierung von FAK (fokalen Adhäsionskinasen) und PTK (Protein Tyrosinkinasen) in eukaryotische Zellen internalisiert werden. Die Funktionen dieser Kinasen sind Teil des Integrin  $\alpha_5\beta_1$  und Fibronektin assoziierten Geflechts, welches die Aufnahme des Bakteriums durch Endozytose ermöglicht. Eine Schlüsselrolle spielt dabei die FAK. Die FAK kontrolliert erstens die Anheftung des Bakteriums und zweitens die Aufnahme des Keims mithilfe des Integrin  $\alpha_5\beta_1$ . Die Aktivierung und vermehrte Aktivität der FAK bei *S. aureus* Infektionen führt zu der Annahme, dass der Keim dafür verantwortlich ist. Unterstützt wird diese These durch Versuche mit FAK defizienten Zellen. Infektionen mit *S. aureus* waren gegenüber den FAK positiven Zellen deutlich geringer invasiv und zeigten weniger Endozytose des Bakteriums (HAUCK ET AL. 2006). Die Osteoblasteninvasion wird in Verbindung mit Aktin-Mikrofilamenten, Mikrotubuli und Clathrin-abhängigen Rezeptoren gebracht. Aufgrunddessen wurde in Untersuchungen von *in-vitro* Osteoblasten Cytochalasin D, ein Aktindepolymerisator zugefügt. Es konnte gezeigt werden, dass mit der so erreichten Suppression der Aktin-Mikrofilamente im zellulären Zytoskelett die Fähigkeit von *S. aureus* massiv eingeschränkt war, in die Osteoblasten zu internalisieren, dort zu proliferieren und Apoptose zu induzieren (ELLINGTON JK ET AL. 1999; MOHAMED W ET AL. 2014).

Speziell relevant für MRSA und eher nicht in MSSA vertreten ist das Virulenzprotein PVL (PVL = Panton-Valentine leukocidin). PVL wird zum überwiegenden Teil CA-MRSA zugeschrieben. Das Protein ist leukotoxisch und Poren-bildend vor allem bei Granulozyten. Es besteht aus den zwei Komponenten LukS-PV und LukF-PV. Diese werden getrennt voneinander von den Staphylokokken ausgeschüttet und bilden dann gemeinsam das sogenannte PVL, welches einerseits die Nekrose der Granulozyten über den Caspaseweg einleitet und andererseits durch Porenbildung in der Granulozytenmembran zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies führt und so Gewebenekrosen herbeiführt (PURELLO ET AL. 2014; BOYLE-VAVRA ET AL. 2007).

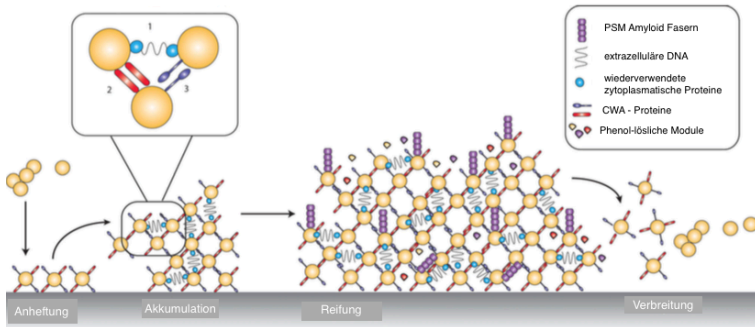
### 1.1.2 Biofilmbildung

Der Biofilm beschreibt eine festgewachsene mikrobielle Gemeinschaft von Zellen, verbunden mit einer Oberfläche oder anderen Zellen, die in eine extrazelluläre polymere Matrix integriert sind. Die Biofilmbildung des Bakteriums *S. aureus* ist von drei wichtigen Ereignissen geprägt. Zu Beginn erfolgt mit Hilfe von Wirtsproteinen die Befestigung des Bakteriums an verschiedenste Oberflächen. Nachfolgend, durch Bildung von verwachsenen Adhäsionen, reift der Biofilm an den Oberflächen aus. Nach vollständiger Reifung des Biofilms wird dieser vor allem durch Murein-Hydrolasen teilweise aufgelöst, um eine Verbreitung der im tiefen Inneren lebenden Bakterien zu ermöglichen (MARAFFINI ET AL. 2006; LISTER ET AL. 2014; KOSTAKIOTI ET AL. 2013). Die Struktur des ausgereiften Biofilms ist durch pilzförmige und kissenförmige Strukturen gekennzeichnet. Zwischen diesen Strukturen bildet ein komplexes Gangsystem die Ernährungsgrundlage und somit Existenz der Bakterien innerhalb der dichten Biofilmmatrix (ARCHER ET AL. 2011; KAPLAN J B 2010). Die Biofilmbildung wird durch das Zusammenspiel verschiedener Komponenten ermöglicht. Zum einen sind die schon erwähnten MSCRAMMs des *S. aureus* (FnBP, Bap = Biofilm-associated protein, SasG = *S. aureus* surface protein, SasC = *S. aureus* surface protein, ClfB) beteiligt und zum anderen Wirtsproteine wie Fibronektin, Fibrinogen (Fib) und Kollagen (Cn) (GIAOURIS ET AL. 2015).

Ein zusätzlich entscheidendes Element der Biofilmbildung ist die extrazelluläre DNA (eDNA) des *S. aureus*. Die eDNA wird während der, durch die Staphylokokken induzierte Autolyse des Biofilms produziert. Ein hierbei relevantes Gen zur Freisetzung der eDNA ist das *cidA*, welches die Murein-Hydrolasen codiert. Murein-Hydrolasen lösen Zellen im Biofilm auf und sorgen somit für eine Freisetzung der eDNA, welche aufgrund der negativen Ladung als ein elektrostatisches Polymer funktioniert, das eine



Bindung der Bakterienzellen zu Oberflächen, Wirtszellen oder auch untereinander ermöglicht (LISTER ET AL. 2014, ARCHER ET AL. 2011, FOSTER ET AL. 2014, ARICOLA ET AL. 2011). In Abbildung 3 wird der Zell-Zell Kontakt durch eDNA während einer Biofilmbildung von *S. aureus* gezeigt.



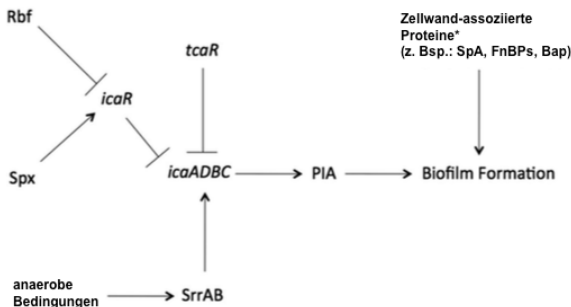
**Abbildung 3 Staphylococcus aureus Biofilmbildung;**

Anheftung: Anbindung an Oberflächen von *S. aureus* durch CWA-Proteine. Akkumulation: Zell-Zell-Kontakte durch mehrere Faktoren. (1) eDNA verbindet die einzelnen Staphylokokken (2) CWA-Proteine verbinden angrenzende Zelloberflächen (3) Homophile Zellverbindung von CWA-Proteinen. PSM Amyloid Fasern sind an der Oberfläche sichtbar im Biofilm. Diese sind auch an der Bildung von Ernährungskanälen beteiligt. PSM = phenol-soluble modulins, CWA = cell-wall anchored (modifiziert nach HOBLEY ET AL. 2015)

RICE ET AL. 2007 konnten in ihrer Studie aufzeigen, dass *cidA* Mutanten einen weniger stabilen Biofilm bildeten, welcher darüber hinaus weniger eDNA enthielt. Das *IrgAB* Gen (leucin rich  $\alpha$ -2-glycoprotein AB), welches als Gegenspieler von *cidA* funktioniert, verhindert über die Beeinflussung der Murein-Hydrolasen die Zellyse und eDNA Freisetzung, um ein Gleichgewicht von ständigem Biofilm und Verbreitung oder Vergrößerung desselbigen zu erhalten. Bei *IrgAB* Mutanten zeigte sich eine verstärkte Biofilmbildung, sowie ein vermehrter eDNA-Gehalt.

Dem polysaccharide intracellular Adhäsion (PIA) wird eine besondere Rolle in der Biofilmentstehung zugeschrieben. PIA kann in der Literatur auch unter der Bezeichnung polymeric N-acetyl-glucosamine (PNAG =) gefunden werden. PIA wird durch die Gene *icaADBC* codiert und wird vor allem unter anaeroben Bedingungen vermehrt gebildet. Das Protein bewirkt eine Aggregation und Ansammlung der Zellen und spielt eine große Rolle für die Ordnung des Biofilms vor allem bei MSSA

Stämmen. Dennoch können *S. aureus* Keime auch ohne PIA erfolgreich Biofilme bilden. So zeigten beispielsweise FITZPATRICK ET AL. (2005), BEENKEN ET AL. (2003) oder BROOKS AND JEFFERSON (2014), dass die Biofilmbildung auch durch andere Oberflächenproteine PIA-unabhängig übernommen werden kann. Vor allem MRSA Stämme sind in der Lage trotz Deletion des *icaADBC* Operons weiterhin Biofilme zu bilden. Bei Stämmen mit *ica*-unabhängiger Biofilmbildung konnte beispielsweise das Bap Protein in Verbindung mit der initialen Adhäsion und der intrazellulären Akkumulation der Staphylokokken gebracht werden. Weiterhin wurde auch das Protein A mit der Biofilmbildung in Verbindung gebracht. MERINO N ET AL. (2009) zeigten jedoch, dass nicht einmal die Zellwandverankerung von Protein A nötig sein musste, um Biofilm zu bilden. Die alleinig exogene Zufuhr des Proteins ermöglichte eine weitreichende Biofilmbildung. Das SasG Protein übernahm bei anderen *icaADBC* mutierten Stämmen die Aufgabe der Biofilmbildung. Die Akkumulation der Bakterienzellen funktionierte Zink-abhängig über einen Verdrehungsmechanismus. Über eine Strukturveränderung der SasG Proteine können diese eine Verbindung eingehen und so zur Aggregation führen. Insgesamt muss erwähnt werden, dass die Protein A-, FnBP- und auch SasG-Biofilmbildung durch hohe Expressionsraten gekennzeichnet sind, was eine Steigerung der Proliferation zur Folge hat. Abbildung 4 zeigt die verschiedenen Wege der Biofilmbildung.



**Abbildung 4: PIA-abhängige und PIA-unabhängige Biofilmbildung *S. aureus*;**

*icaADBC* Expression führt zu PIA Produktion und Biofilmbildung. Die Genexpression von *icaADBC* kann durch *icaR* und *tcaR* unterdrückt werden. Die Expression von *icaR* wiederum wird von *Spx* stimuliert und durch *Rbf* gehemmt. Anaerobe Bedingungen führen über *SrrAB* zur *icaADBC* Gruppenexpression. \*Die PIA-unabhängige Biofilmbildung wird durch Zellwand-assoziierte Proteine mit Zell-Zell-Kontakt ermöglicht (vor allem MRSA-spezifisch). Häufig vorkommende Proteine sind SpA, FnBP, Bap; Rbf = regulator of biofilmformation, Spx = surface protein x, tcaR = transcription regulator R, icaR = intracellular adhaesion locus R, SrrAB = staphylococcal respiratory response AB, icaADBC = intracellular adhaesion locus ADBC, PIA =

polysaccharide intracellular adhaesin, SpA = surface protein A, Bap = biofilm-associated protein, FnBP = fibronectin-binding protein; (modifiziert nach ARCHER N K ET AL. 2011)

Ein Weiteres Biofilm regulierendes System ist *agr* / *sarA* (*agr* = accessory gene regulator, *sarA* = staphylococcal accessory regulator A). Erhöhte Raten von *sarA* Produkten sind in Biofilmen vorzufinden. Hochreguliert und durch *sarA* kontrolliert ist beispielsweise das *agr* Gen. Während in der exponentiellen Phase hauptsächlich CWA-Proteine produziert werden, so hat die Synthese von Zellgiften und zersetzenden Proteinen in der postexponentiellen Phase Vorrang. Dieser Wechsel wird durch das *agr* System ermöglicht. Obwohl die vermehrte Expression von *agr* zur Bildung von unterschiedlichsten Virulenzfaktoren wie Protein A, PVL oder  $\alpha$ -Hämolysin führt, ist das *agr* System eher negativ stimulierend auf die Biofilmbildung. Dies liegt an dem positiven Einfluss auf Nukleasen und Proteasen, welche hemmend auf die Entwicklung eines Biofilms einwirken. Doch in Studien von VALLE ET AL. 2003 oder BEENKEN ET AL. 2012 konnte gezeigt werden, dass eine Mutation von *sarA* und damit eine verminderte *agr* Expression bei *S. aureus* Stämmen keinesfalls zu einer verbesserten und exzessiveren Biofilmbildung führte, sondern eher eine gegenteilige Wirkung brachte. Dieses Ergebnis ist darauf zurückzuführen, dass Nukleasen und Proteasen, die einen negativen Einfluss auf die Biofilmbildung haben, durch *sarA* herunterreguliert werden. Es überwiegt also bei Staphylokokken mit *sarA* die Förderung des *icaADBC* Operons, welches wiederum durch PIA die Biofilmbildung aktiviert (CUE ET AL. 2012, LEE ET AL. 2015, ARCHER ET AL. 2011).

*S. aureus* benötigt den Transkriptionsfaktor  $\sigma^B$  (sigma B) zur Reaktion auf Stressfaktoren der Umwelt. Als Triggerfaktoren zur Aktivierung können Antibiotika, hohe Temperaturen, pH-Veränderungen und eine hohe Osmolarität fungieren. Besteht kein Stress für das Bakterium wird  $\sigma^B$  nicht aktiviert. RACHID ET AL. 2000 zeigten in ihren Experimenten, dass  $\sigma^B$  nötig für die *icaADBC* Transkription und Biofilmproduktion bei hohen NaCl-Werten. Biofilmentstehung unter anaeroben Konditionen ist ebenfalls  $\sigma^B$  gesteuert. So wird die Expression von *icaADBC* hochreguliert und von *icaR* unterdrückt. Weiterhin fördert  $\sigma^B$  eine Biofilmbildung über die Unterdrückung von *agr* und positive Regulierung von *sarA*.

## 1.2 Implantat-assoziierte Infektionen

### 1.2.1 Relevanz

Im Durchschnitt findet sich eine Infektionsrate von 2 – 5% bei operativer Frakturversorgung und elektiver Endoprothetik (DAROUCHE ET AL. 2004, BORENS ET AL. 2016, MÜHLHOFER ET AL. 2016). Laut ZIMMERLI W (2014) liegt das Risiko einer Infektion zwischen 0,4% - 16,1% nach Osteosynthese. Diese Schwankung ist vornehmlich durch die sehr hohen Infektionsraten bei offenen Frakturen zu erklären. So konnte in Studien von Zimmerli et al. (2011) und von Gustilo et al. bereits 1990 gezeigt werden, dass offene Frakturen vom Typ I Frakturen eine Infektionsrate von 1,8%, Typ IIIB Frakturen hingegen schon eine Infektionsrate von 12,3% (ZIMMERLI ET AL. 2011, GUSTILO ET AL. 1990) aufweisen. Bei periprothetischen Gelenkinfektionen beschreibt ZIMMERLI W (2014) weiterhin eine Rate von 0,3 - 9%. Einbezogen wurden hier Hüft-, Knie- und Sprunggelenkprothesen.

Die finanzielle Belastung durch Implantat-assoziierte Infektionen kann nicht in einer exakten Summe angegeben werden. So spielen Alter, Geschlecht, Art der Verletzung und Länge der Behandlung eine entscheidende Rolle. Die negative Auswirkung auf die Lebensqualität des Patienten sollte hierbei nicht unterschätzt werden (ALT ET AL. 2014). DAROUCHE postulierte 2004, dass die medizinische und chirurgische Behandlung der Implantat-assoziierten Infektionen nach Frakturversorgung im Durchschnitt bei 15.000 USD liegen, die Kosten von periprothetischer Infektionsbehandlung bei ungefähr 30.000 USD pro Fall. In den USA werden die Gesamtkosten im Jahr 2016 auf ungefähr 1,2 Milliarden USD geschätzt, mit steigender Tendenz in den Folgejahren (KURTZ ET AL. 2012). Neuere Hochrechnungen zeigen, dass die Kosten pro Patienten mit Implantat-assoziiierter Infektion inklusive der vollständigen Behandlung und Kosten aller beteiligten Fachrichtungen bei 50.000 – 100.000 USD liegen. Die Kosten sind dabei abhängig von Art der OP, ob Frakturosteosynthese, Knie- oder Hüftendoprothese (THAKORE ET AL. 2016, KURTZ ET AL. 2008) Tabelle 2).

**Tabelle 2: Kurzübersicht Epidemiologie der Implantat-assoziierten Infektionen;**

(modifiziert nach DAROUICHE 2004, KURTZ ET AL. 2008, KURTZ ET AL. 2012, THEKORE ET AL. 2015)

Studie	Prozeduren / Infektionen	Kosten bei Infektion
DAROUICHE (2004): <i>Treatment of Infections Associated with Surgical Implants</i>	<u>Gelenkprothesen jährlich (USA):</u> 600.000 / Prognose: 12.000 Infekte <u>Osteosynthese Implantate jährlich (USA):</u> 2.000.000 / Prognose 100.000 Infekte	<u>Geschätzte Kosten:</u> 30.000 USD p. P. <u>Geschätzte Kosten:</u> 15.000 USD p. P.
KURTZ ET AL. (2008): <i>Infection Burden for Hip and Knee Arthroplasty in the United States</i>	<u>Primäre &amp; Revisions- Hüftendoprothese:</u> 1990: 163.818 o. l. / 1104 m. l. (USA) 2004: 226.615 o. l. / 3352 m. l. (USA) <u>Primäre &amp; Revisionsknieendoprothese:</u> 1990: 175.789 o. l. / 1090 m. l. (USA) 2004: 490.180 o. l. / 5838 m. l. (USA)	<u>Primäre &amp; Revisions HTEP:</u> 1990: 67.415 USD p. P. 2004: 70 378 USD p. P. <u>Primäre &amp; Revisions KTEP:</u> 1990: 59.491 USD p. P. 2004: 56.275 USD p. P.
KURTZ ET AL. (2012): <i>Economic burden of Periprosthetic Joint Infection in the United States</i>	<u>Hüft- Prothesenersätze nach Infektion:</u> 2001: 4.545 (USA) 2009: 7.162 (USA) <u>Knie- Prothesenersätze nach Infektion:</u> 2001: 7.113 (USA) 2009: 14.802 (USA)	<u>Revisions HTEP:</u> 2001: 72.700 USD p. P. 2009: 93.600 USD p. P. <u>Revisions KTEP:</u> 2001: 58.700 USD p. P. 2009: 74.900 USD p. P.
THEKORE ET AL. (2015): <i>Surgical site infection in orthopedic trauma: A case-control study evaluating risk factors and cost</i>	<u>1819 Trauma-Patienten (USA):</u> 78 mit Infektion	<u>Mediane Kosten:</u> 108.782 USD p. P. (Kosten für Krankenhausaufenthalt und Wiederaufnahme)

o. l. = ohne Infektion, m. l. = mit Infektion

### 1.2.2 Pathogenese

Implantat-assoziierte Infektionen oder Infektionen orthopädischer Implantate entstehen durch verschiedene Wege, vor allem bezüglich der initialen Besiedlung der Krankheitserreger auf dem Implantat. Am häufigsten gelangt *S. aureus* durch die Operationswunde intraoperativ oder bei offenen Frakturen bereits durch die offene Wunde zum Implantat. Alternativ können auch über eine hämatogene Streuung die Bakterien auf die Implantatoberfläche gelangen. Zusätzliche sekundäre Erkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus, begünstigen eine rasche Besiedlung des Keimes in dem vulnerablen Gebiet. Entscheidend für die Besiedlung sind die extrazellulären Matrixproteine (EZM) rund um den Knochen und die Implantate. Hierzu zählen z. Bsp. das Fibronectin, Kollagen oder das Fibrinogen (MONTANARO L ET AL. 2011). An diesen Proteinen können sich die Staphylokokken, insbesondere *S. aureus*, über Adhäsionsproteine anbinden. Die Adhäsionsproteine sind zumeist aus der MSCRAMM-Familie (Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules), wie bspw. den fibrinogen-bindenden Proteinen (fnBP), den Koagulse-Proteinen (clf) oder

den Kollagen-Adhäsinen (Cna) (FRAUNHOLZ M, SINHA B 2012). Zum einen Teil werden hierbei auch einzelne Zellen invadiert, wie bspw. auch Osteoblasten (MOHAMED W ET AL. 2014), zum anderen Teil lagern sich die Bakterien an den in der Unfallchirurgie und Orthopädie überwiegend metallischen Implantaten oder Plastikimplants mithilfe der EZM-Proteine an. Nach erfolgreicher Besiedlung erfolgt die Kolonisierung und letztendlich die Ausbildung eines schützenden Biofilms. Dies führt als Endresultat entweder zu einer akuten oder zu einer chronischen Infektion.

### **1.2.3 Klinik**

Die Klinik der Infektionen unterscheidet sich anhand des Erscheinungsbildes. Tritt eine sehr rasche und fulminant verlaufende akute Infektion auf, zeigt diese sich in grundlegend anderer Form als die der chronischen Infektion. Ein klinisches Resultat beider Infektionsarten könnte bspw. die infizierte Pseudarthrose sein (ALT ET AL. 2012). Akute Infektionen zeigen sich hierbei durch einen sehr raschen und fulminanten Verlauf nach der Operation mit klassischen Infektionsanzeichen der Rötung, dem Schmerz, der Schwellung und Fieber. Diese akuten Infektionen, die durch hochvirulente Erreger wie *S. aureus* verursacht werden, können teilweise schwerwiegende Sepsen auslösen, wenn diese nicht zeitgerecht und korrekt behandelt werden. Chronische Infektionen zeigen einen oftmals relativ langen Verlauf ohne akute Infektionszeichen, sind dafür jedoch vor allem durch eine chronische Fistelbildung mit Flüssigkeitssekretion gekennzeichnet. Als Sonderform der akuten Infektion ist vor allem die zumeist durch hämatogene Streuung bedingte Infektion von Bakterien auf bislang klinisch unauffällige Implantate zu nennen. Durch diese Sonderform können Implantate sekundär besiedelt werden und ebenfalls eine akute Krankheitssymptomatik auslösen (ZIMMERLI ET AL. 2014, TRAMPUZ ET AL. 2006).

**Tabelle 3: Vergleich der Klassifikationen: Unfallchirurgische Osteosynthese / periprothetische Infektionen**

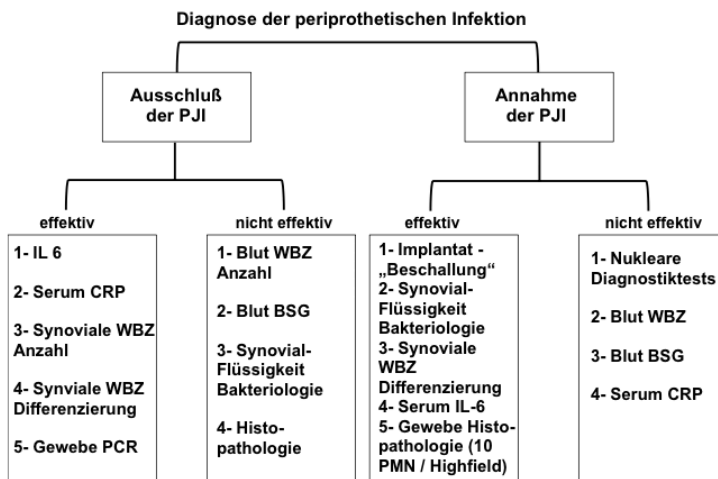
(modifiziert nach MONTANARO ET AL. 2011, ARCIOLA ET AL. 2015, TRAMPUZ ET AL. 2006, BARETT ET AL. 2015, ZIMMERLI ET AL. 2014, ZIMMERLI W 2011, METSEMAKERS W J 2016)

	<b>Infektion der unfallchirurgischen Osteosynthese</b>	<b>periprothetische Infektionen</b>
<b>Akute Infektion</b>	<b>&lt; 2 Wochen</b>	<b>&lt; 3 Monate</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Klassische Infektionszeichen (rubor, calor, dolor, tumor und functio laesa)</li> <li>▪ Große Hämatome</li> <li>▪ Systemische Infektionszeichen (Fieber, Schüttelfrost, grippe-ähnliche Symptomatik)</li> <li>▪ Wundheilungsstörung</li> <li>▪ Nekrosen</li> <li>▪ Hoch virulente Erreger (z. Bsp. <i>S. aureus</i>, Streptokokken, Enterokokken)</li> <li>▪ Durch hämatogene Streuung anderer Infekte auslösbar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Klassische Infektionszeichen (rubor, calor, dolor, tumor und functio laesa)</li> <li>▪ Große Hämatome</li> <li>▪ Systemische Infektion kann fehlen</li> <li>▪ Prothesennaher Gelenkschmerz</li> <li>▪ Wundheilungsstörung</li> <li>▪ Hoch virulente Erreger (z. Bsp. <i>S. aureus</i>, Streptokokken, Enterokokken)</li> <li>▪ Durch hämatogene Streuung anderer Infekte auslösbar</li> </ul>
<b>Chronische Infektion</b>	<b>&gt; 10 Wochen</b>	<b>&gt; 6 Monate</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fehlende systemische Symptome</li> <li>▪ Infizierte Pseudarthrose</li> <li>▪ Funktioneller, belastungsabhängiger Schmerz</li> <li>▪ Beeinträchtigte Frakturheilung</li> <li>▪ Niedrig virulente Erreger (z. Bsp. <i>S. epidermidis</i>)</li> <li>▪ Durch hämatogene Streuung anderer Infekte auslösbar</li> <li>• Fistelbildung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Lokale Entzündung</li> <li>▪ Gelenkerguss</li> <li>▪ Fistelbildung</li> <li>▪ Implantatlockerungen</li> <li>▪ Niedrig virulente Erreger (z. Bsp. <i>S. epidermidis</i>, <i>P. acnes</i>)</li> <li>▪ Durch hämatogene Streuung oder exogen durch offene Wunde auslösbar</li> </ul>

### 1.2.4 Diagnostik

Für die Diagnostik der Implantat-assoziierten Knocheninfektionen stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Die diagnostischen Werkzeuge sind die klinische Untersuchung, Laboruntersuchungen, Bildgebung (Sonographie, Röntgen, CT, MRT,

PET-CT) Synovialflüssigkeitsentnahme durch Gelenkpunktion und die intraoperative histologische Probenentnahme mit der entsprechenden mikrobiologischen Aufarbeitung. Zudem gewinnen auch moderne diagnostische Methoden, wie die Behandlung der entnommenen Implantate mit Ultraschall (Sonikation) und die molekulare Diagnostik, mittels PCR (Polymerasekettenreaktion) immer mehr an Bedeutung (ZIMMERLI ET AL. 2011). Die diagnostischen Algorithmen variieren nach Zentrum und Klinikum der einzelnen Länder weltweit. Verschiedene Behandlungspläne zur Implantat-assoziierten Knocheninfektion stehen weltweit zur Verfügung. AHMAD ET AL. (2016) befassten sich in ihren Untersuchungen mit der Diagnostik der PJI (periprosthetic joint infection). Abbildung 5 stellt die Möglichkeiten zur Diagnostik der PJI nach AHMAD ET AL. (2016) dar.



**Abbildung 5: Die Diagnose der periprotetischen Infektion;**

Empfohlener Ansatz um eine PJI auszuschließen oder zu bestätigen in einem prothetischen Gelenk. PJI = periprosthetic joint infection, IL 6 = Interleukin 6, CRP = C reaktives Protein, WBZ = Weiße Blutzellen, PCR = polymerase chain reaction, BSG = Blutsenkungsgeschwindigkeit, PMN = polymorphnuclear cells. (modifiziert nach AHMAD ET AL. 2016)

#### Labordiagnostik:

Für die Labordiagnostik stehen einige Parameter zu Verfügung. Hierunter fallen vor allem ein vollständiges Blutbild, die Erythrozytensedimentationsrate (ESR) und das C-reaktive Protein (CRP). Dabei muss berücksichtigt werden, dass vor allem die ESR und das CRP eher zur Ausschlussdiagnostik geeignet sind und die ESR heute kaum noch



Anwendung findet. Beständig hohe CRP Werte bzw. erneut ansteigende CRP-Werte nach einer OP bspw. geben den Hinweis auf eine Infektion. Somit eignen sich diese Parameter erstens für den Nachweis eines frühen Infektes nach einer OP, bei vorherigen niedrigen Werten oder zweitens bei akuten Infektionen im Zusammenspiel mit der dazugehörigen Klinik. Dennoch weisen beide Parameter Schwächen auf, da sowohl das CRP als auch die ESR nicht nur spezifisch auf Entzündungsreaktionen einer infizierten Prothese oder eines Implantates reagieren. CRP zeigt somit zwar eine hohe Sensivität, jedoch eine geringe Spezifität (LEE ET AL. 2015, COSTA ET AL. 2012, BERBARI ET AL. 2010). Leukozytenerhöhungen hingegen sind nicht spezifisch und sensitiv, um eine Aussage über eine evtl. Infektion zu treffen (METSEMAKERS ET AL. 2016). Serum-Leukozyten haben keinen Stellenwert in der Diagnostik der Implantat-assoziierten Infektionen (MAFFULLI ET AL. 2016, ZIMMERLI ET AL. 2011, ZMISTOWSKI ET AL. 2014).

#### Gelenkpunktion:

Die Gelenkpunktion und damit einhergehende Untersuchung der Synovialflüssigkeit ist ein häufig verwendetes diagnostisches Werkzeug, um Implantat-assoziierte Knocheninfektionen zu analysieren, vor allem bei Gelenkprothesen. Die Punktion muss unter sterilen Bedingungen erfolgen und dient der mikrobiologischen sowie zytologischen Diagnostik. Vor allem die Zellzahlbestimmung der synovialen Flüssigkeit ist entscheidend (MÜHLHOFER 2016). Demzufolge wird beispielsweise die Anzahl und Differenzierung der Leukozyten untersucht, welche einen wichtigen Hinweis auf eine Implantat-assoziierte Osteomyelitis geben können. Die cut-off Werte der weißen Blutkörperchen und ihre Differenzierung sind unterschiedlich beschrieben. Die cut-off Werte der Leukozyten in der Synovia schwanken für eine Diagnosestellung von  $>3.000/\mu\text{l}$  bis zu  $25.000/\mu\text{l}$ . Hierbei muss beachtet werden, dass die Parameter in akute und chronische Infektionen aufgeteilt werden müssen. Die höheren cut-off Werte ab  $>10.000/\mu\text{l}$  liegen bei Akutinfektionen vor, die niedrigeren cut-off Werte ab  $>3.000/\mu\text{l}$  bei chronischen Infektionen. Mitbegleitend sind die Parameter der Leukozyten-Differenzierung ähnlich schwankend von  $>64\%$  bis  $>80\%$  Neutrophilen Granulozyten, um eine Implantat-assoziierte Infektion zu beweisen (PETRETTA ET AL. 2016; SCHINSKY ET AL. 2008; TRAMPUZ ET AL. 2004; MAFFULLI ET AL. 2016; ZIMMERLI ET AL. 2011; MÜHLHOFER 2016; GHANEM ET AL. 2008).

Eine weitere Möglichkeit durch Gelenkpunktion ist die mikrobiologische Untersuchung, zum Beispiel durch die Entnahme von Synovialflüssigkeit. Bei diesen Gelenkaspirationen kann es jedoch dazu kommen, dass die Kultivierung negativ

ausfällt. GEHRKE ET AL. (2015) beschreiben eine 45%ige Rate an negativen Proben bei Knieendoprothesen, welche jedoch nicht eine Infektion ausschließen.

#### Bildgebung

Die Bildgebung ist ein weiteres hilfreiches diagnostisches Tool, um Entzündungsprozesse zu erkennen und Umbauprozesse der von der Infektion betroffenen Regionen zu analysieren. Zur bildgebenden Diagnostik stehen das bewerte Röntgen, das CT und die MRT zur Verfügung. Hinzu kommen neuere Verfahren, wie das PET-CT (Positronenemissionstomographie-CT) oder die Radionuklid-gelabelte Bildgebung (RENZ ET AL. 2016; ZIMMERLI ET AL. 2011). Die bildgebende Diagnostik kann für verzögerte oder chronische Implantat-Infektionen eingesetzt werden (BORENS ET AL. 2016), wohingegen der Nutzen bei akutem und subakutem klinischem Krankheitsbild deutlich eingeschränkt ist. Die native Röntgenaufnahme in 2 Ebenen beispielsweise kann nach ca. 2 Wochen radiologische Zeichen, wie periostale Elevationen, kortikale Unterbrechungen und Osteolysen zeigen (MAFULLI ET AL. 2015). Das CT und MRT können die eventuelle Ausdehnung des periprothetischen Infektes darstellen, auch intramedullär. Darüber hinaus ermöglichen beide Verfahren eine Begutachtung des Weichgewebe, im Hinblick auf Fistelentstehung und Abszessbildung und die Stabilität des Implantats. Der Nachteil des CT und MRT besteht jedoch in der Bildung von Artefakten durch die Interaktion mit den Implantaten während der Aufnahme. Dieses Phänomen kann zu beträchtlichen Einschränkungen der Sicht und sowie Qualität der Diagnosestellung führen. Das PET-CT und die radionuklid-gelabelte Bildgebung kann zusätzlich das Vorliegen eines Infektes ausschließen, eine hämatogene Infektion jedoch nicht (HELLER 2016; BORENS ET AL. 2016; MAFULLI 2015; DELLA VALLE 2011; ZIMMERLI 2011; METSEMAKERS ET AL. 2016; TRAMPUZ ET AL. 2006; MÜHLHOFER 2016).

#### Histopathologie:

Die Histopathologie nimmt einen hohen Stellenwert in der Diagnostik der periprothetischen oder Implantat-assoziierten Infektionen ein. Die Entnahme von Gewebe sollte möglichst dicht an dem Implantat und dem vermuteten Infektgeschehen liegen. Generell sollten mindestens zwei Gewebeproben für den Nachweis einer Infektion positiv sein und mit der entsprechenden Mikrobiologie übereinstimmen. Weiterhin kann auch der nekrotische Knochen mit den dazugehörigen Knochensequestern auf Keime untersucht werden. Bakterien nutzen diesen toten Raum als Rückzugsort zur Vermehrung und zum Schutz. Darüber hinaus kann durch

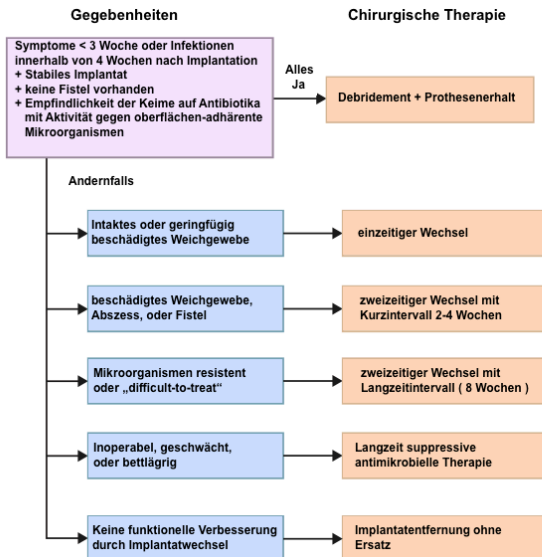
die histologische Untersuchung ein Malignom mit ausgeschlossen werden (RENZ ET AL. 2016; METSEMARKERS ET AL. 2016; BORENS ET AL. 2016, TRAMPUZ ET AL. 2006).

Nachteilig bei der Histopathologie ist die schwierige Diagnostik bei chronischen Infektionen mit niedrig virulenten Erregern, da diese eine eindeutige Immunantwort vermissen lassen können. Zudem existieren noch keine einheitlichen Definitionen zur Klassifikation einer akuten Infektion (TANDE AJ, PATEL R 2014).

### **1.2.5 Therapie**

Die Behandlung der Implantat-assoziierten Knocheninfekte ist prinzipiell nach der Biofilmbildung des Keims zu richten. Deshalb sind die Behandlungsstrategien zwischen den akuten und chronischen Infektionen unterschiedlich. Sollte eine akute Infektion vorherrschen, ist die Wahrscheinlichkeit eines vollkommen ausgebildeten Biofilms als gering einzustufen. Dementgegen muss bei verzögerten oder chronischen Infektionen der Implantate damit gerechnet werden, dass sich ein stabiler Biofilm schon formiert hat, welcher mit einer undurchdringlichen Biofilmmatrix gewissermaßen einen „Schutzpanzer“ gegen das körpereigene Immunsystem sowie gegen Antibiotika bildet (DAROUICHE ET AL. 2004). Somit können akute Infektionen mit dem Ziel des Implantaterhalts therapiert werden, während bei chronischen Infektionen das Implantat oftmals entfernt werden muss. Hinzukommend sind die schwer behandelbaren multiresistenten Keime, welche die antibiotischen Behandlungsmöglichkeiten zusätzlich einschränken.

Für die Behandlung von periprotetischen Gelenkinfektionen existieren momentan drei chirurgische Hauptbehandlungsmöglichkeiten: Erstens das Debridement und der Erhalt der eingebauten Prothese im Falle einer akuten Infektion, zweitens der einzeitige Wechsel der Prothese und drittens der zweizeitige bzw. mehrzeitige Wechsel der Prothese bei chronischen Infektionen (Abb. 6).

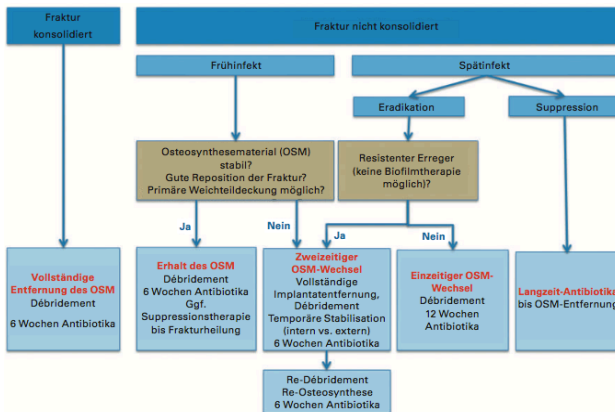


**Abbildung 6: Chirurgischer Behandlungsalgorithmus für periprotetische Infektionen;**

„Difficult-to-treat“ Mikroorganismen enthalten Keime mit Resistenzen zu Antibiotika mit guter oraler Bioverfügbarkeit, rifampin-resistente Staphylokokken, Enterokokken, und chinolon-resistenz Gram-negative Bazillen und Pilze. (Modifiziert nach ZIMMERLI ET AL. 2011)

Bei akuten Infektionen nach Osteosynthese bei der Frakturbehandlung ist die Fraktur oftmals noch nicht konsolidiert und das Ziel der Behandlung sollte sein, das Implantat zumindest so lange zu erhalten, bis eine vollständige Konsolidierung der erreicht ist. Voraussetzungen hierfür sind gute Stellungsverhältnisse der Fraktur, eine intakte Weichteildeckung der Operationsregion und ein stabiles Implantat. Die Behandlung besteht dann aus einem Debridement und einer prolongierten Antibiotika-Therapie bis zur Ausheilung der Fraktur.

Chronische Infektionen, sowie akute Infektionen mit schlechter Frakturposition und nicht möglicher Weichteildeckung werden einem zweizeitigen Osteosynthesematerialwechsel unterzogen. Hierbei wird das entsprechende Implantat vollständig entfernt, debridiert, ggfs. eine temporäre Stabilisierung vorgenommen und eine Antibiotikatherapie eingesetzt. Danach folgt eine erneute Anlage von Osteosynthesematerial mit Debridement und erneuter 6-wöchiger Antibiotikatherapie.



**Abbildung 7 Behandlungsalgorithmus der periimplantären Infektion;**

OSM = Osteosynthesematerial (modifiziert nach RENZ ET AL. 2016)

### 1.3 Zielstellung der Dissertation

Die vor allem frühzeitige und dennoch eindeutige Diagnostik der Implantat-assoziierten Infektion ist bis zum heutigen Zeitpunkt sehr schwierig. Nur das Zusammenspiel der zuvor erwähnten Diagnostikmethoden kann nach verzögerter Auswertung eine Information über die Schwere der Infektion ermitteln. Keimvirulenzen und Biofilmbildung sind hierbei jedoch oftmals kein wesentlicher Bestandteil in der heutigen Standarddiagnostik und können somit für die erfolgreiche Behandlung dieser Infektionen nicht verwendet werden, obwohl sie für die Pathogenese und auch den Verlauf der Infektion eine wichtige Rolle spielen.

Das Ziel dieser Dissertation ist zum einen die Untersuchung einer Korrelation des Virulenzverhaltens von *Staphylococcus aureus* Keimen im Vergleich zum klinischen Verlauf der ausgelösten Implantat-assoziierten Infektion, sowie zum anderen die Evaluation eines *Galleria mellonella in-vivo* Infektionsmodell zur Bestimmung des Virulenzverhaltens der Keime. Die Hauptuntersuchungen zur Virulenzbestimmung bestanden aus dem *Galleria mellonella in-vivo* Infektionsmodell, der *in-vitro* Osteoblasteninfektion, dem Proliferationsverhalten und der Biofilmbildung der *S. aureus* Bakterien. Weitere für die Studie zusätzlich wichtige grundlegende Untersuchungen waren die Wachstumskurvenbestimmung, das MTT- Assay und die RT-PCR-Untersuchung.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Software

❖ Bench AirClean 600 PCR Workstation	AirCleanSystems Creedmoor NC USA
❖ Bench MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific Waltham MA USA
❖ Mikroplatten Photometer	Thermo Fisher Scientific Waltham MA USA
❖ Brutschrank	Heraeus Instruments Hanau DE
❖ Brutschrank 37°C	Labotec Göttingen DE
❖ Bunsenbrenner Campinggaz gasprofil 1	Campinggaz Hattersheim DE
❖ CO <sub>2</sub> Brutschrank Labotec Incubator C16	Labotec Göttingen DE
❖ CO <sub>2</sub> Brutschrank Thermo Forma Sterile Cycle Inkubator HEPA Filter	Thermo Fisher Scientific Waltham MA USA
❖ Drehtisch Sensorturn pro	WLD-TEC GmbH Göttingen DE
❖ Kühlschranks	Liebherr Bulle CHE
❖ Laptop Dell Latitude E6510	Dell Round Rock Texas USA
❖ Mikroapplikator	World Precision Instruments Sarasota FL USA
❖ Mikroskop Will Wilover S	Hund Wetzlar DE
❖ Nano Drop	Thermo Fisher Scientific Waltham MA USA
❖ Notebook Samsung	Samsung Seoul KOR
❖ PCR Maxwell MDX	Promega Madison WI USA
❖ Phomo Mikrotiterplatten-Reader	Anthos Mikrosysteme GmbH Krefeld DE
❖ Pipetboy Comfort IBS StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Integra Biosciences Zizers CHE Life Technologies (Applied Biosystems), Darmstadt DE
❖ Rührschüttler RCT basic	IKA Werke Staufen DE
❖ Schüttelinkubator KS 4000i control	IKA Werke Staufen DE
❖ Schüttler / Taumler	Heidolph Schwabach DE

Heidolph Polymax 1040	
❖ Spin perfect Spin	Peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen DE
❖ TECAN NanoQuant infinite M200 Pro	Tecan Group Männedorf CHE
❖ UV-Vis-Spektrometer Genesis 10S	Thermo Fisher Scientific Waltham MA USA
❖ Vacuumpumpe Vacuboy BS	Integra Biosciences Zizers CHE
❖ Vortex Genie 2	Scientific Industries Bohemia NY USA
❖ Wasserbad Grant Sub Aqua	Grant Instruments Ltd Royston GBR
❖ Zentrifuge Perfect Spin 24	Peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen DE

### 2.1.2 Instrumentarium

❖ 0,5-10µl (Biohit M 10), 2-20µl (Biohit M 20), 10-100µl (Biohit M 100), 20µl-200µl (Biohit M200), 100µl-1000µl (Biohit M 1000) -Pipetten	Biohit Deutschland Göttingen DE
❖ 10µl-, 20µl-, 100µl-, 200µl- und 1000µl Filtertips	Nerbe plus GmbH Winsen DE
❖ 24-Well Platten Multiwell Falcon sterile	Thermo Fisher Scientific Waltham MA USA
❖ 96-Well Platten Nunclon TM Delta Surface + Deckel (F-Form und U-Form)	Thermo Fisher Scientific Waltham MA USA
❖ Reaktionsröhrchen 1,5ml & 2,0ml	Eppendorf AG Hamburg DE
❖ Erlenmeyer Kolben 100ml	Duran Productions GmbH & Co. KG Mainz DEU
❖ Reaktionsröhrchen 2,5ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50 ml-Pipetten	Cellstar Greiner Bio-one Kremsmünster AUT
❖ Impfschlingel blau 10µl, weiß 1µl	Sarstedt AG&Co Nümbrecht DE
❖ Insulinspritze	Hajovital KG Neuwied DE
❖ Parafilm 4 IN x 125 Ft	Parafilm Oshkosh WI USA
❖ PCR Verschlussfolien	Brand Scientific GmbH Wetheim DE
❖ Petrischalen groß (145x20mm)	Sarstedt AG&Co Nümbrecht DE

❖ Petrischalen klein (40x12mm)	Sarstedt AG&Co Nümbrecht DE
❖ Petrischalen mit Blutagar	BD Corp Franklin Lakes NJ USA
❖ Petrischalen mit Brain-Heart-Infusionbroth (BHI)-Agar	Medizinischen Mikrobiologie UKGM Giessen DEU
❖ Pipette 8er 10-100µl	Eppendorf AG Hamburg DE
❖ Pipettenspitzen blau	Sarstedt AG&Co Nümbrecht DE
❖ Pipettenspitzen gelb	Sarstedt AG&Co Nümbrecht DE
❖ Trigalsky-Spatel	Heathrow Scientific Vernon Hills IL USA
❖ Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit	Promega Madison WI USA

### 2.1.3 Chemikalien

❖ Triton X-100	Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg DEU
❖ 1x PBS (phosphate buffered saline)	Thermo Fisher Scientific Waltham MA USA
❖ Essigsäure	Merck KGaA Darmstadt DEU
❖ Ethanol	Sigma-Aldrich München DE
❖ BHI medium	Firma (die das Pulver herstellt)?
❖ EDTA / Trypsin	Sigma Aldrich München DE
❖ Fetales Kalbserum (FKS)	Biochrom Berlin DEU
❖ Gentamycin 50mg/ml	Thermo Fisher Scientific Waltham MA USA
❖ Hanks Solution (Gibco)	Thermo Fisher Scientific Waltham MA USA
❖ MEM Medium (Gibco)	Thermo Fisher Scientific Waltham MA USA
❖ NaCl 0,9%	B. Braun Melsungen DE
❖ Non-essential Amino Acid	Thermo Fisher Scientific Waltham MA USA
❖ TSB Medium	Merck KGaA Darmstadt DEU



### 2.1.4 Medien & Puffer

- ❖ Biofilm Puffer (2 mM CaCl<sub>2</sub> + 2 mM MgCl<sub>2</sub>)
- ❖ PCR Puffer Eurogentec MasterMix 2x
- ❖ Kristall Violet 0,05g in 50ml Aquadest

### 2.1.5 Primer

- ❖ PCR Forward Primer  $\alpha$ - (5'CAACAACACTATTGCTAGGTTCCATATT 3' )  
Hämolysin 10 pmol Operon Eurgenetic Köln DEU
- ❖ PCR Forward Primer PVL 10 (CAACTTATGGTAATGAAATGTTTTAGGC)  
pmol Operon Eurgenetic Köln DEU
- ❖ PCR Reverse Primer  $\alpha$ - (5'CCTGTTTTTACTGTAGTATTGCTTCCAA 3)  
Hämolysin 10 pmol Operon Eurgenetic Köln DEU
- ❖ PCR Reverse Primer PVL 10 (ACCTCTGGATAACACTGGCATTTT) Operon  
pmol Eurgenetic Köln DEU
- ❖ PCR Sonde  $\alpha$ -Hämolysin 10 (Fam-ATGAATCCTGTCGCTAATGCCGAGA-  
pmol Tamra) Operon Eurogenetic Köln DEU
- ❖ PCR Sonde PVL 10 pmol (Fam-  
AAAGCACTTAAATGCTGGACAAAACCTTCTTGGA-  
TAMARA) Operon Eurogenetic Köln DEU
- ❖ Template 5ng/ $\mu$ l DNA-Extrakte von *S. aureus* Stämmen

### 2.1.6 Keime

Es wurden sieben MSSA *S. aureus* Keime und ein MRSA *S. aureus* Keim für die Untersuchungen verwendet. Alle Keime stammen von Implantat-assoziierten Knocheninfekten unfallchirurgischer Patienten aus unterschiedlichen Wundarealen. Alle Keime wurden durch den Analytischen-Profil-Index (API) biochemisch charakterisiert und folgendermaßen benannt:

**Tabelle 4: Einteilung der *Staphylococcus aureus* Keime durch den Analytischen-Profil-Index**

1	EDCC 5455	MSSA
2	EDCC 5456	MRSA
3	EDCC 5457	MSSA
4	EDCC 5458	MSSA
5	EDCC 5459	MSSA
6	EDCC 5460	MSSA
7	EDCC 5461	MSSA
8	EDCC 5464	MSSA

EDCC - Eugen Domann Culture Collection, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Giessen.

**EDCC 5455:** Am 10.10.2013 isolierter Keim, der zu einer akuten Infektion bei einem 66-jährigem männlichen Patienten führte. Das Infektionsgebiet lag im Bereich des Olecranon bei einliegender Zuggurtungs-Osteosynthese.

**EDCC 5456:** Am 22.12.2013 isolierter Keim, der zu einer chronischen Infektion bei einem 66-jährigem männlichen Patienten führte. Das Infektionsgebiet lag im Bereich des proximalen Femurs bei einliegender Hüft-TEP.

**EDCC 5457:** Am 24.06.2014 isolierter Keim der zu einer akuten Infektion bei einem 33-jährigem männlichen Patienten führte. Das Infektionsgebiet lag im Bereich der distalen Fibula bei einliegender Plattenosteosynthese.

**EDCC 5458:** Am 26.07.2014 isolierter Keim, der zu einer akuten Infektion bei einem 54-jährigem männlichen Patienten führte. Das Infektionsgebiet lag im Bereich des distalen Femurs bei einliegender Plattenosteosynthese.

**EDCC 5459:** Am 12.08.2014 isolierter Keim, der zu einer akuten Infektion bei einer 62-jährigen weiblichen Patientin führte. Das Infektionsgebiet lag im Bereich des proximalen Humerus bei einliegender Plattenosteosynthese.

**EDCC 5460:** Am 10.08.2014 isolierter Keim, der zu einer chronischen Infektion bei einem 60-jährigem männlichen Patienten führte. Das Infektionsgebiet lag im Bereich der distalen Tibia bei einliegendem Arthrodesen-Nagel.

**EDCC 5461:** Am 11. 08.2014 isolierter Keim, der zu einer chronischen Infektion bei einem 55-jährigem männlichen Patienten führte. Das Infektionsgebiet lag im Bereich des proximalen Femurs bei einliegendem intramedullärem Nagel.

**EDCC 5464:** Am 25.08.2014 isolierter Keim, der zu einer chronischen Infektion bei einem 70-jährigem männlichen Patienten führte. Das Infektionsgebiet lag im Bereich der distalen Fibula, wo sich eine Plattenosteosynthese befand. Mitbegleitend lag bei diesem Patienten ein intramedullärer Tibiainnenbohrer vor.

### 2.1.7 Versuchstiere/-zellen

#### Galleria mellonella:

Die *Galleria mellonella* Wachsraupen von der Firma Fauna topics Zoobedarf, Zucht- und Handels GmbH, Marbach/N.-Rielingshausen wurden in einer Futtermischung (Maismehl (22%), Weizenkeime (22%), Trockenhefe (11%), Bienenwachs (17,5%), Honig (11%), Glycerin (11%)) bei 30°C in einem lichtgeschützten Brutschrank in großen Petrischalen gehalten. Für den Versuch wurden ähnlich große Larven ausgewählt und in kleine Petrischalen mit der Futtermischung umgelagert.

#### SAOS-2 Osteosarkomzellen:

Die Osteosarkomzellen, welche ursprünglich aus einem Tumor einer weiblichen Person (Caucasian) von J FOGH & G TREMPER 1973 entstammen, wurden in MEM (MEM = minimal essential medium) versetzt mit 10% Fetalem Kalbserum und 1% nicht essentiellen Aminosäuren, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Wachstumskurven der *S. aureus* Stämme

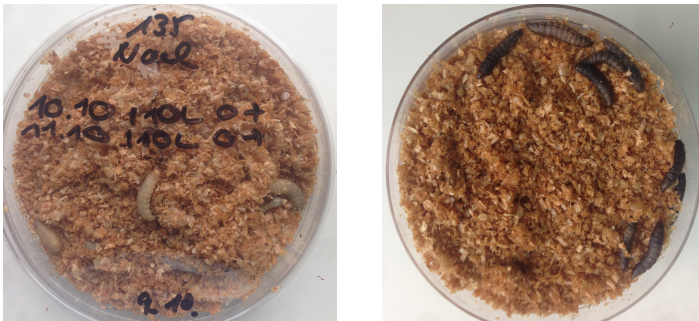
Zur Herstellung der Wachstumskurven wurde zunächst eine ÜNK aus zwei bis drei Bakterienkolonien mit BHI Nährmedium bei 37°C im Schüttelinkubator mit 180rpm hergestellt. Diese wurde am nächsten Morgen auf ein Verhältnis von 1:100 mit frischem BHI Nährmedium verdünnt. Die Suspension wurde ab dem Inkubationszeitpunkt alle 30 min per optischer Dichtmessung gemessen. Zusätzlich erfolgte zwischen den Zeitpunkten 2,5; 3,0 und 3,5 Stunden eine logarithmische Verdünnungsreihe zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten. Es erfolgte stets eine 3fach Ausplattierung der Suspensionen mit 100µl auf BHI-Nähragarplatten. Dreifach ausplattiert und ausgezählt wurden zu jedem Zeitpunkt die letzten drei Verdünnungsstufen.

### 2.2.2 Infektionsversuch mit *Galleria mellonella*

Die Wachsraupen wurden in Petrischalen mit einer Futtermischung bei 30°C im lichtgeschützten Brutschrank aufbewahrt. Pro Bakterienstamm wurde der Versuch dreifach ausgeführt. Zum Beginn des Versuches wurden drei Übernachtskulturen (ÜNK) in BHI-Medium in einem Schüttelinkubator mit 180rpm (Rotation per minute) bei 37°C, hergestellt. Am nächsten Morgen wurden die ÜNKs auf 1:20 in frischem BHI (Brain-Heart-Infusion) verdünnt. Um eine OD<sub>600</sub> von ungefähr 1 zu erhalten, inkubierten die 1:20 Verdünnungen weitere zweieinhalb Stunden bei 180rpm und 37°C in einem Schüttelinkubator. Mithilfe der zweieinhalb stündigen Wachstumskurven wurde die Bakterienanzahl/ml bestimmt und die exakt benötigte Menge errechnet. Diese ausgerechnete Menge wurde dann in ein 1,5ml Reaktionsröhrchen pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation (8.000rpm, 3min) und abpipettieren des Überstandes. Nach der Aufnahme des Bakterienpellet in NaCl 0,9% und vortexen, folgten diese Schritte noch zwei weitere Male. Nun wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten hergestellt. Ausgezählt wurde der Wert der 10<sup>-6</sup>-Verdünnung durch Dreifachbestimmung und Bildung des Mittelwertes. Nun folgte die Herrichtung des Mikroapplikators mit Einspannen der Feindosierungsspritze. Die Injektionssuspension von 10<sup>6</sup> Bakterien /10µl sollte hierbei nicht überschritten werden. Pro Bakterium wurden 3x 10 Larven sowie 1x 10 Larven mit NaCl 0,9% zur Verlaufskontrolle infiziert. Die Larven wurden über fünf Tage ausgezählt und die Ergebnisse in Form eines Diagramms dargestellt. Die Einteilung der Keime nach ihrem Virulenzgrad erfolgte durch die Überlebensraten der Wachsmottenlarven. Als „tot“ galten die Larven, die auch nach leichtem Anstoßen durch die Pinzette keine Regung von sich gaben. Die folgende Tabelle zeigt die Einteilung der Virulenzgrade nach Vorlage durch das Institut der medizinischen Mikrobiologie Gießen:

**Tabelle 5 Einteilung des Virulenzgrades der *S. aureus* Keime anhand der Überlebensrate der Gallerien**

Virulenzgrad	Beschreibung
I	Hoch virulent Kriterium: 0 – 20 %ige Überlebensrate bei einem Tag post infectionem
II	Intermediär virulent Kriterium: 20 – 80 %ige Überlebensrate bei einem Tag post infectionem
III	Niedrig virulent Kriterium: 0 – 20 %ige Überlebensrate bei einem Tag post infectionem



**Abbildung 8 *Galleria mellonella* Larven;**

Zwei Beispielbilder aus der Versuchsreihe. Linksseitig lebende helle Larven mit Futtermischung in der Petrischale aus der Natrium-Chlorid-Negativkontrollgruppe. Rechtsseitig tote und schwarz verfärbte Larven mit Futtermischung in der Petrischale.

### 2.2.3 Osteoblasteninvasionsmodell

Die SAOS-2-Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C in sterilen Petrischalen mit MEM-Medium gehalten. 48h vor dem Infektionsversuch wurden die Zellen auf 24-Well Platten ausgesät. Hierfür wurden die SAOS-2-Zellen zunächst unter dem Mikroskop begutachtet, um das Dichtewachstum, den Zellstatus und die Zellintegrität beurteilen zu können. Nachfolgend wurde das MEM unter sterilen Bedingungen entfernt, ohne dabei die SAOS-2-Zellschicht zu beschädigen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen durch Zugabe von 10 ml Hanks Lösung gewaschen. Durch Zugabe von 1 ml Trypsin (kalt aus dem Kühlschrank) und fünf Minuten Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen abgelöst. Es folgte die Kontrolle und Begutachtung der gelösten SAOS-2 Zellen unter dem Mikroskop. Anschließend wurde 20 ml MEM Medium auf die Schale gegeben. Die Verteilung der Suspension erfolgte mit je 1 ml auf Petrischalen und 24-Well-Platten. Schlussendlich folgte eine letzte Begutachtung der neu befüllten Petrischalen und Wellplatten, ob ausreichend Zellen auf alle Wells und Schalen gleich verteilt waren. Die ausgesäten Zellen wurden 2 Tage in Brutschrank inkubiert bis zum Infektionsversuch (MOHAMED W ET AL. 2014).

In einem Versuch wurden parallel zwei Bakterienstämme untersucht. Alle Stämme wurden dreimalig getestet. Es wurden pro Versuch vier Zeitpunkte ( $t = 3,5; 7; 11$  und  $23$  h) gemessen. Zunächst wurden ÜNKs mit BHI hergestellt und am nächsten Tag 1:100 verdünnt. Diese wurden weiter inkubiert. Während dieser Zeit wurde die SAOS-2-

Zellzahl unter dem Mikroskop bestimmt. Hierzu wurde ein Well mehr auf der ersten Wellplatte mit SOAS-2-Zellen versehen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen einmal mit Hanks Lösung gewaschen, mittels Trypsin abgelöst und mit Hilfe einer Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Die durchschnittliche Zellzahl betrug  $2-4 \times 10^5$  Zellen/Well. Die Infektion erfolgte mit  $\text{MOI} = 30$  (MOHAMED W ET AL. 2014).

Nach einer halben Stunde Infektionszeit im  $\text{CO}_2$ -Brutschrank wurden die Zellen zweimal mit MEM gewaschen. Die Zellen wurden dann mit MEM + 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Gentamycin versetzt, um die extrazellulären Bakterien abzutöten. Nach 3,5; 7; 11 und 23h wurden die Zellen mit 1% PBS zweimal gewaschen und dann mit Triton x-100 Detergenz behandelt. Nach zehn Minuten Einwirkzeit wurden die SAOS-2 Zellwände nachfolgend noch einmal mechanisch mit der Pipette zerstört. Nach Anlegen einer Verdünnungsreihe wurden alle Verdünnungen und das unverdünnte Well in dreifach Bestimmung ausplattiert (MOHAMED W ET AL. 2014).

#### **2.2.4 MTT Assay**

Der MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid) Assay dient dem Nachweis von metabolischer Zellaktivität. Die Aktivität der NAD(P)H-abhängige Oxidoreduktase korreliert mit der Zellviabilität. Durch dieses Enzym wird die Tetrazolium-Struktur von MTT reduziert und in das unlösliche violette Formazan umgewandelt.

Bis zu den Untersuchungszeitpunkten  $t = 3,5; 7; 11$  und 23h erfolgte exakt die gleiche Prozedur mit den Zellen, welche zuvor im Osteoblasteninfektionsassay beschrieben ist. Nach 3,5; 7; 11 und 23h wurde das Medium entfernt und die Zellen 2x mit 1% PBS gewaschen. Danach wurde RPMI-Lösung mit 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  MTT zu den Zellen gegeben. Es erfolgte eine Inkubation von 60 min bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ . Nach der Inkubation wurde das MTT-haltige Medium entfernt und 500 $\mu\text{l}$  pro Well Isopropanol mit 5% Ameisensäure zugegeben. Zum Lösen des Formazans wurden die Zellen bei 400-500rpm geschüttelt. Anschließend wurden jeweils 3x100 $\mu\text{l}$  aus jedem Well der 24-Well-Platte in 3 Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Die Messung erfolgte mit dem Tecan-Meßgerät (Programm Magellan) bei einer Wellenlänge von 562nm.

#### **2.2.5 Biofilm-Assay**

Pro Bakterienstamm wurden drei Untersuchungen durchgeführt. Für die Biofilmentwicklung wurde eine 96-Well Platte benötigt, auf der alle Bakterienstämme,

eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle getestet wurden. Als Positivkontrolle fungierte der Biofilmbildner *S. aureus* EDCC 5055 und als Negativkontrolle TSB Medium. Die Herstellung der ÜNKs erfolgte mit 20 ml TSB. Am Folgetag wurden die ÜNKs auf 1:100 in TSB verdünnt, gevortext und pro Bakterienstamm, Positivkontrolle und Negativkontrolle 180 µl in jedes Well einer achter-Reihe (bspw. A-H) pipettiert. Nun erfolgte eine 24 stündige Inkubation verschlossen im CO<sub>2</sub>-Brutschrank. Nach der Inkubation wurde das Medium vorsichtig von der Well-Platte entfernt, ohne den Biofilm zu beschädigen. Nachfolgend wurde ein zweimaliger Waschschrift mit 200 µl sterilem Wasser durchgeführt und jedes Well mit 220 µl 0,01% Kristallviolett gefärbt. Nach 15 minutiger, lichtgeschützter Färbung auf einem Taumler, wurde die flüssige Farbe wieder entfernt. Darauffolgend wurden zwei Waschschriffe wiederholt und die Farbkristalle in Essigsäure auf dem Taumler für 20-30min gelöst. 125 µl der Farblösung pro Well wurden dann in gleicher Reihenfolge auf eine 96-Well-Platte mit flachem Boden umpipettiert und bei 595 nm im Plattenphotometer gemessen.

#### **2.2.6 DNA Isolation**

Für den Versuch wurde das PCR-Maxwell MDX Device genutzt. Zu Beginn wurde das Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit vorbereitet. Hierzu wurde eine Kartusche des Kits pro Stamm in das Maxwell-Rack gesetzt. Vor jede Kartusche mussten 0,5 ml Elutiontubes mit 100µl „Nuclease free water“ und offenem Deckel in Richtung zur Person gesteckt werden. Nun wurde die Folie der Kartuschen vorsichtig abgezogen, um keine Flüssigkeit aus den Vertiefungen zu verlieren. Nachfolgend konnte der Stößel („Plunger“) in die 7. Vertiefung (die am weitesten entfernte zu den Elutiontubes) gesteckt und 2-3 Bakterienkolonien aus Blutagarplatten mit einer blauen Impfschlinge in die 1. Vertiefung nach den Elutiontubes eingebracht werden. Es erfolgte die Aktivierung des Maxwell-Geräts. Darauffolgend wurde das Rack eingesetzt und das Programm eingestellt. Hierzu wurde das Programm „Anthoni“ mit Untersuchung auf „DNA“ justiert. Nach 35 Minuten musste das Rack mit den acht Proben aus dem Gerät entnommen werden. In die offenen Elutiontubes wurde zum Schluss 400µl „Nuclease free water“ hinzugesetzt. Die Proben aus den Elutiontubes konnten anschließend per Nanodrop-Verfahren auf den DNA Gehalt getestet werden.

#### **2.2.7 Realtime PCR**

Die PCR-Ansätze wurden auf Eis pipettiert und setzten sich aus sechs verschiedenen Bestandteilen zusammen. Das Template bestand jeweils aus den DNA-Extrakten der

*S. aureus*-Stämme. Tabelle 6 zeigt die Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die PVL und  $\alpha$ -Hämolysin-PCR:

**Tabelle 6: Zusammenstellung des PVL und  $\alpha$ -Hämolysin -PCR-Reaktionsansatzes**

Reagenz	Bezeichnung	Volumen
<i>Aqua dest.</i>		5,5 $\mu$ l
Forward Primer [10pmol]	PVL bzw. hly Forward	0,75 $\mu$ l
Reverse Primer [10pmol]	PVL bzw. hly Reverse	0,75 $\mu$ l
Sonde [10pmol]	PVL bzw. hlySonde	0,5 $\mu$ l
Puffer	Eurogentec MasterMix 2x	12,5 $\mu$ l
Template	DNA-Extrakte von <i>S. aureus</i> Stämmen (5ng/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l

Der folgende Amplifikationszyklus wurde verwendet:

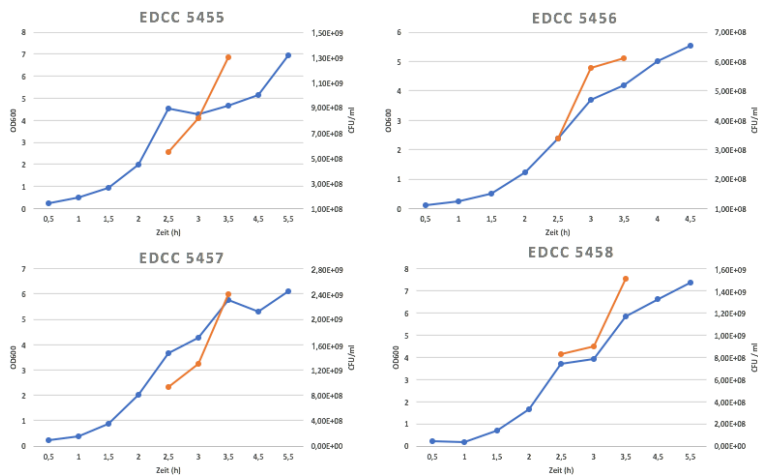
Initialisierung	50°C	2min	} 40 Zyklen
Denaturierung	95°C	10min	
Annealing	95°C	15s	
Elongation	62°C	1min	



### 3 Ergebnisse

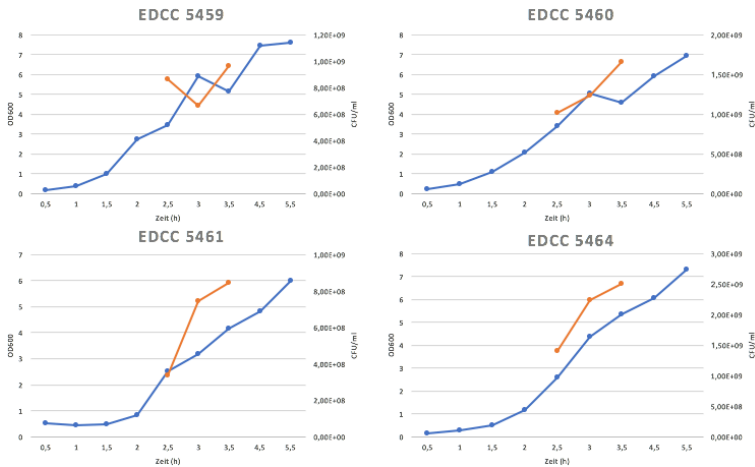
#### 3.1 Wachstumskurven

Die Untersuchung mit dem gewählten Zeitfenster zur Ausplattierung der Bakterien zwischen 2,5 – 3,5 Stunden konnte zeigen, dass sich alle Keime in der log-Phase (log = logarithmisch), also demzufolge in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Diese Datenerhebung war grundlegend für das nachfolgende Osteoblasteninfektionsassay. Abbildung 9 und 10 zeigen die optische Dichte des jeweiligen Keimes in einem Zeitraum zwischen 0,5 bis 5,5 Stunden mit Messung alle halbe Stunde und parallel die CFU/ml (colony-forming-units) des jeweiligen Keimes zu den Zeitpunkten  $t = 2,5; 3,0$  und  $3,5$  h:



**Abbildung 9: Wachstumskurven für *S. aureus* EDCC 5455, 5456, 5457 und 5458;**

Die blaue Kurve zeigt die OD<sub>600</sub>. Die rote Kurve zeigt die CFU / ml.



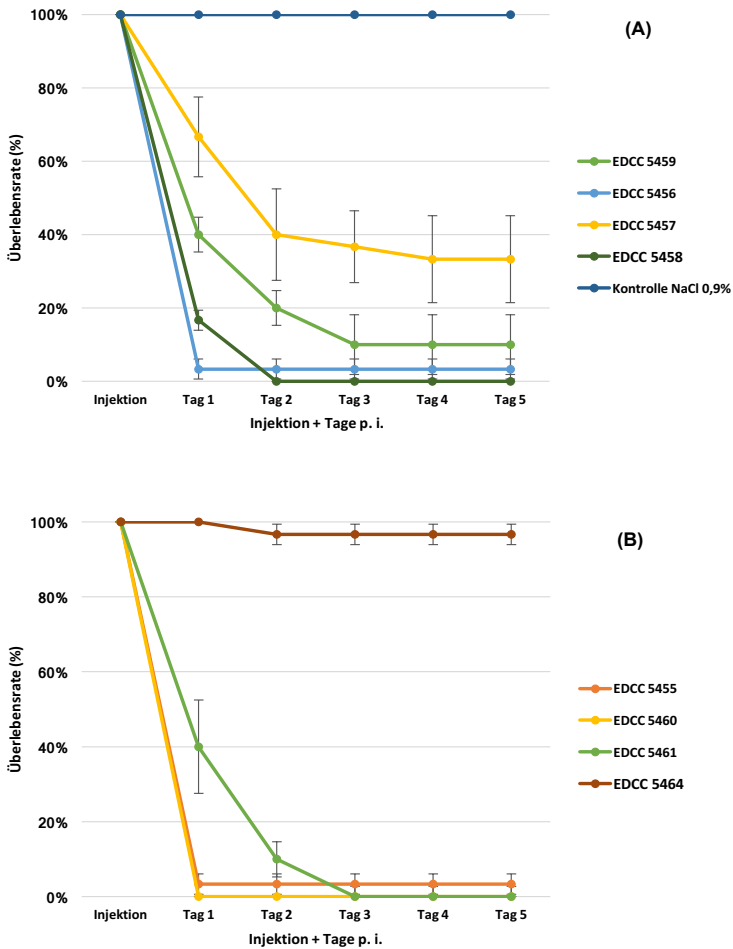
**Abbildung 10: Wachstumskurven für *S. aureus* EDCC 5459, 5460, 5461 und 5464;**

Die blaue Kurve zeigt die OD<sub>600</sub>. Die rote Kurve zeigt die CFU / ml. Die Kurve von EDCC 5459 zeigt einen Wachstumsknick, der am ehesten durch eine Hypoxiephase im Wachstum zu erklären ist.

### 3.2 Infektionsversuch mit *Galleria mellonella*

Die Ergebnisse des *Galleria mellonella* Infektionsassays zeigten Unterschiede im Virulenzverhalten aller acht Keime (Abb. 11). Die Mehrfachversuche eines jeden Keimes korrelierten. Die gewählte Inokulationsdosis von  $10^6$  CFU/10 $\mu$ l ermöglichte messbare Differenzen der Keimvirulenzen in der Pilotgruppe. Ein Keim, EDCC 5464 wurde als „niedrig virulent“, mit einer Überlebensrate von 100% ein Tag p. i. (post infectionem), eingestuft. Die Keime EDCC 5459, EDCC 5457 und EDCC 5461 konnten als „intermediär virulent“ mit unterschiedlichen Überlebensraten zwischen 20-80% ein Tag p. i. eingeteilt werden und die Keime, EDCC 5455, EDCC 5456, EDCC 5458 und EDCC 5460 wurden als „hoch-virulent“ mit einer Überlebensrate von unter 20% ein Tag p. i. eingestuft.

Wie zu erwarten zeigten die NaCl 0,9% Kontrollgruppen ohne Keim eine 100%ige Überlebensrate.



**Abbildung 11: Überlebensrate der Gallerien nach Infektion mit *S. aureus*;**

Diagramm (A) beinhaltet die *S. aureus* Stämme EDCC 5456, EDCC 5457, EDCC 5458, EDCC 5459 und exemplarisch die Negativkontrolle mit NaCl 0,9%. Das Diagramm (B) zeigt die *S. aureus* Stämme EDCC 5455, EDCC 5460, EDCC 5461 und EDCC 5464. Jede Larve wurde mit einer Konzentration von  $1 \times 10^8$  CFU infiziert. Pro Stamm wurden 30 Larven untersucht und die Anzahl der lebenden Larven nach 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden aufgezeichnet. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

### 3.3 Osteoblasteninvasionsmodell

Das Osteoblasteninfektionsmodell diente als Untersuchung der Invasivität von den acht gewählten *S. aureus* Stämmen. Hierbei wurde die Anzahl der sich in den SAOS-2-Zellen befindlichen Bakterien zu den vier gewählten Zeitpunkten bestimmt. Die Untersuchung sollte Aufschluß darüber bringen, ob innerhalb der Spezies *S. aureus* ein unterschiedliches Invasionsverhalten vorliegt.

#### 3.3.1 Invasivität 1h post infectionem

Zur Bestimmung der Invasivität wurde die Konzentration der Infektionsdosis mit der intrazellulären Konzentration eine Stunde nach Infektion verglichen. Hierzu wurde der prozentuale Anteil errechnet. Die Ergebnisse im Invasions-Assay eine Stunde post infectionem zeigten Unterschiede zwischen den 8 untersuchten *S. aureus* Stämmen. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse dargestellt.

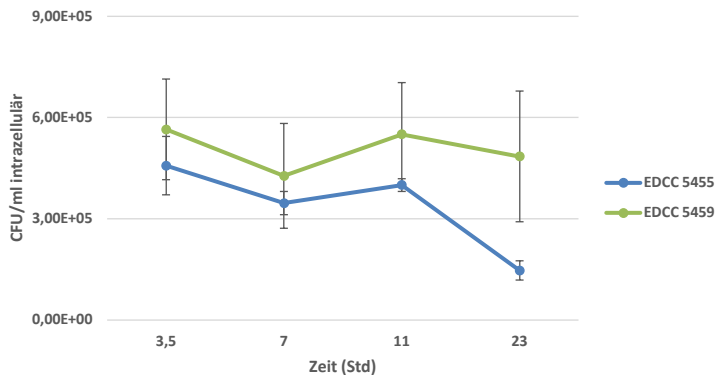
**Tabelle 7: Invasivität der *S. aureus* Stämme;**

<i>S. aureus</i>	EDCC 5455	EDCC 5456	EDCC 5457	EDCC 5458	EDCC 5459	EDCC 5460	EDCC 5461	EDCC 5464
Infektionsdosis (CFU/ml)	1,09E+08	5,80E+07	5,47E+07	2,76E+07	1,14E+08	9,95E+07	4,06E+07	4,54E+07
intrazellulär 1h post infection (CFU/ml)	3,35E+05	2,61E+05	2,32E+06	2,79E+06	1,38E+06	6,67E+05	8,69E+05	1,17E+06
Invadierter Anteil (%)	0,31	0,45	4,24	10,09	1,21	0,67	2,14	2,58

#### 3.3.2 Intrazelluläres Wachstum von *S. aureus* in Osteoblasten

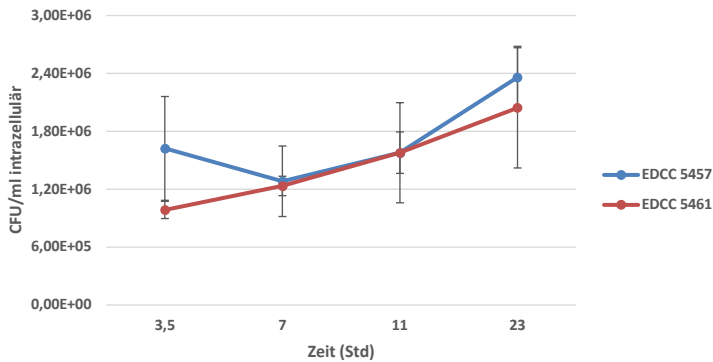
Die Ergebnisse des *in-vitro* Osteoblasteninfektions-Assay zeigten, dass sich die verschiedenen *S. aureus* Stämme in ihrem Proliferationsverhalten und ihrer Invasivität differenzieren. Die Anzahl intrazellulärer Bakterien wurde an vier Zeitpunkten, 3,5; 7; 11 und 23 Stunden, ausgewertet. Die Einstufung der Keime erfolgte anhand der Proliferation und dem Konzentrationsabfall in den Kurven. EDCC 5455 und EDCC 5459 beispielsweise zeigten ein wechselndes Muster von Wachstum mit Konzentrationsanstieg und Konzentrationsabfall innerhalb des gewählten Zeitraums.

EDCC 5456 und EDCC 5460 hingegen verzeichnen zu Beginn der Untersuchung bis zu dem Zeitpunkt von sieben Stunden einen leichten Konzentrationsanstieg und nachfolgend einen leichten, aber kontinuierlichen Konzentrationsabfall der Bakterien in den SAOS-2 Zellen. EDCC 5457 und EDCC 5461 hingegen steigern im gesamten Untersuchungszeitraum kontinuierlich ihre Konzentration. EDCC 5464 wiederum sinkt in der Konzentration im gewählten Untersuchungsbereich und zeigt somit kein Wachstum. Der verbliebene *S. aureus* Stamm EDCC 5458 hingegen zeigt ein deutliches Wachstum zwischen den 3,5 und 7 Stunden und danach einen rapiden Abfall der Konzentration. In Abbildung 12-15 sind die Ergebnisse der *S. aureus* Stämme in Diagrammen bezüglich der ähnlichen Konzentration paarig dargestellt:



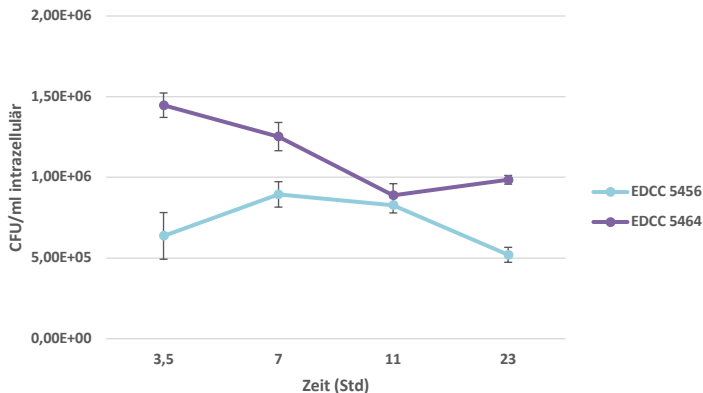
**Abbildung 12: Osteoblasteninfektion mit *S. aureus* EDCC 5455 und EDCC 5459;**

Osteoblasten wurden mit *S. aureus* mit MOI 30 infiziert. Nach 30 min Infektion wurden die extrazellulären Bakterien durch Zugabe von 30µg/ml Gentamycin abgetötet und die Zellen weitere 23h bei 37°C inkubiert. Nach 3,5; 7, 11 und 23h wurden die Zellen lysiert und die Anzahl der intrazellulären Bakterien durch Ausplattieren verschiedener Verdünnungen auf Agarplatten bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert +/- Standardfehler dargestellt.



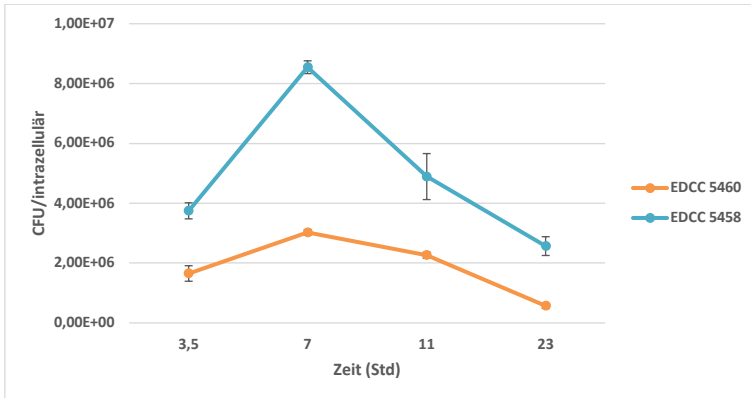
**Abbildung 13: Osteblasteninfektion EDCC 5457 und EDCC 5461;**

Osteblasten wurden mit *S. aureus* mit MOI 30 infiziert. Nach 30 min Infektion wurden die extrazellulären Bakterien durch Zugabe von 30µg/ml Gentamycin abgetötet und die Zellen weitere 23h bei 37°C inkubiert. Nach 3,5; 7, 11 und 23h wurden die Zellen lysiert und die Anzahl der intrazellulären Bakterien durch Ausplattieren verschiedener Verdünnungen auf Agarplatten bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert +/- Standardfehler dargestellt.



**Abbildung 14: Osteblasteninfektion EDCC 5456 und EDCC 5464;**

Osteblasten wurden mit *S. aureus* mit MOI 30 infiziert. Nach 30 min Infektion wurden die extrazellulären Bakterien durch Zugabe von 30µg/ml Gentamycin abgetötet und die Zellen weitere 23h bei 37°C inkubiert. Nach 3,5; 7, 11 und 23h wurden die Zellen lysiert und die Anzahl der intrazellulären Bakterien durch Ausplattieren verschiedener Verdünnungen auf Agarplatten bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert +/- Standardfehler dargestellt.



**Abbildung 15: Osteblasteninfektion EDCC 5460 und EDCC 5458;**

Osteblasten wurden mit *S. aureus* mit MOI 30 infiziert. Nach 30 min Infektion wurden die extrazellulären Bakterien durch Zugabe von 30µg/ml Gentamycin abgetötet und die Zellen weitere 23h bei 37°C inkubiert. Nach 3,5; 7, 11 und 23h wurden die Zellen lysiert und die Anzahl der intrazellulären Bakterien durch Ausplattieren verschiedener Verdünnungen auf Agarplatten bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert +/- Standardfehler dargestellt.

**Tabelle 8: Einstufung der Virulenz der *S. aureus* Stämme;**

Die *Staphylococcus aureus* Stämme sind anhand der Kriterien Konzentrationsanstieg und Konzentrationsabfall intrazellulär geordnet. Beide Kriterien wurden zu jedem Messzeitpunkt 3,5, 7, 11 und 23 Stunden untersucht ((-) = Nein; (+) = Ja; (0) = gleichbleibendes Niveau)

<b>S. aureus Stamm</b>	<b>Konzentrationsanstieg</b>			<b>Konzentrationsabfall</b>		
	<b>3,5 - 7</b>	<b>7 - 11</b>	<b>11 - 23</b>	<b>3,5 - 7</b>	<b>7 - 11</b>	<b>11 - 23</b>
<b>EDCC 5455</b>	(-)	(0)	(0)	(+)	(0)	(0)
<b>EDCC 5456</b>	(+)	(0)	(-)	(-)	(0)	(+)
<b>EDCC 5457</b>	(-)	(0)	(+)	(+)	(0)	(-)
<b>EDCC 5458</b>	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
<b>EDCC 5459</b>	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
<b>EDCC 5460</b>	(+)	(0)	(-)	(-)	(0)	(+)
<b>EDCC 5461</b>	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
<b>EDCC 5464</b>	(0)	(-)	(0)	(0)	(+)	(0)

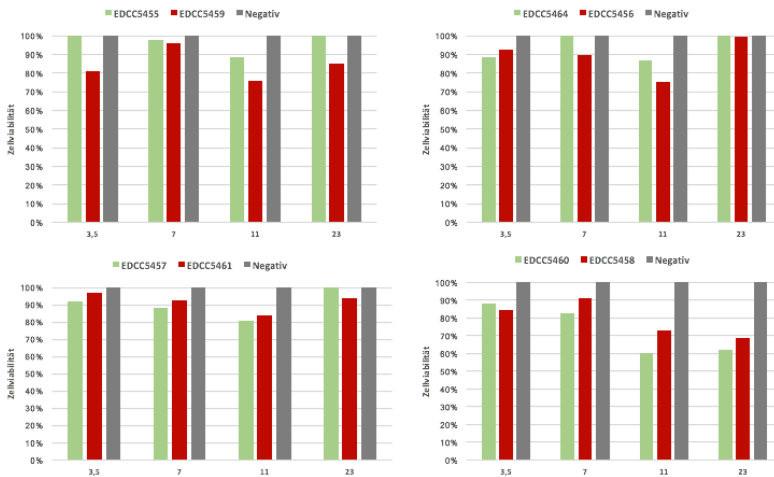
### 3.3.3 MTT Viabilität

Das MTT-Viabilitätsassay diente zur Abklärung der Lebensfähigkeit von mit *S. aureus* infizierten SAOS-2-Zellen. Die Lebensfähigkeit wurde an den gleichen vier Zeitpunkten, wie im Osteoblasteninfektionsmodell untersucht.

Die Ergebnisse des MTT-Assay zeigten unterschiedliche Lebensfähigkeiten der mit den *S. aureus* Stämmen infizierten SAOS2 Zellen. Während die SAOS2-Zellen infiziert mit EDCC 5458 und EDCC 5460 im Vergleich zur Negativkontrolle nach 23h Infektion



eine Abnahme der Viabilität zeigen, zeigen die SAOS2-Zellen infiziert mit EDCC 5457 und EDCC 5461 nach 23h eine Viabilität auf einem gleichen Niveau wie nach 3,5h. Zellen hingegen, die mit den Keimen EDCC 5464 und EDCC 5456 infiziert wurden, verzeichnen sogar ein leichtes Wachstum, ähnlich der Negativkontrolle. Abbildung 16 zeigt die Viabilität der mit den *S. aureus* infizierten SAOS2-Zellen und der nicht infizierten SAOS2-Zellen, als „Negativkontrolle“ gekennzeichnet.



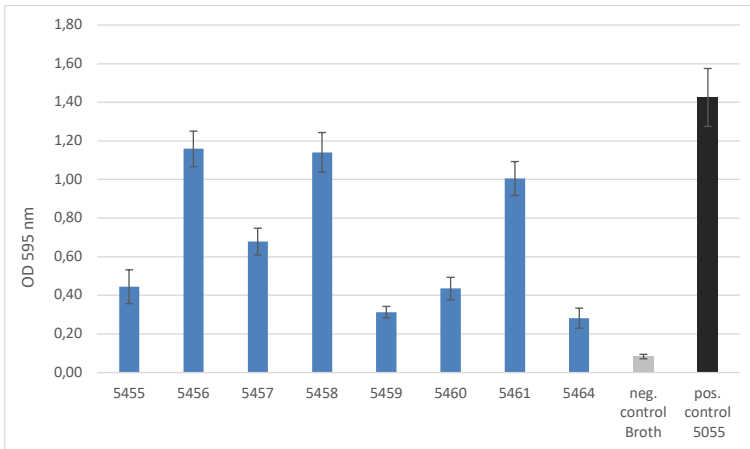
**Abbildung 16: Viabilität der SAOS2-Zellen infiziert mit *S. aureus*;**

Die Abbildung zeigt die Viabilität der SAOS-2 infiziert mit den acht gewählten *S. aureus* Stämmen. Die Viabilität ist in Prozent angegeben und errechnet sich durch die Negativkontrolle, welche zu jedem Zeitpunkt eine 100%ige Viabilität zeigte. Die Messung erfolgt nach 3,5, 7, 11 und 23h.

### 3.4 Biofilm-Assay

Die Biofilmbildung der Bakterien wurde anhand der Adhärenzfähigkeit der Keime an PVC-Plastik gemessen. Bei der Einteilung der Biofilmbildung wurde auf das Modell von CHRISTENSEN ET AL. 1985 Bezug genommen. In dieser Studie wurde die Biofilmbildung durch die Adhärenzfähigkeit in drei Kategorien aufgeteilt: „nicht adhärent“, „schwach adhärent“ und „stark adhärent“. Als „nicht-adhärent“ wurden alle Keime eingestuft, die unter der dreifachen Standardabweichung + Mittelwert der TSB-Negativkontrolle lagen. Die Biofilmbildung in diesem Assay wurde bei einer OD von 595nm Wellenlänge gemessen. In dieser Studie lag der „nicht adhärente“ Wert bei unter 0,246. Alle „mäßig

adhärenten“ Keime lagen im Bereich von 0,246 – 0,492 und als „stark adhärent“ wurden alle Keime über 0,492 bezeichnet. Die Negativkontrolle bestand aus TSB-Medium ohne Bakterien, die Positivkontrolle stellte der Stamm EDCC 5055 dar. Vier der Keime, EDCC5456, EDCC 5057, EDCC 5058 und EDCC 5061, wurden als „stark adhärent“, alle übrigen vier Keime als „mäßig adhärent“ eingestuft. Dementsprechend lag kein „nicht adhärenter“ Keim in diesem Assay vor. Abbildung 17 zeigt das Diagramm der Biofilmbildung.



**Abbildung 17: Biofilmbildung aller 8 untersuchten *S. aureus* Stämme;**

Das Diagramm zeigt die Biofilmbildung der acht untersuchten Isolats, EDCC 5455, EDCC 5456, EDCC 5457, EDCC 5458, EDCC 5459, EDCC 5460, EDCC 5461 und EDCC 5464 und der Positivkontrolle EDCC 5055. Als Negativkontrolle wurde TSB Medium verwendet. Die Wellenlänge der optische Dichtemessung beträgt 595nm. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte +/- SEM dargestellt.

### 3.5 Realtime PCR

Die Realtime PCR diente der Detektion von typischen in der *S. aureus* Spezies befindlichen Virulenz-Genen. Die Gene  $\alpha$ -Hämolysin und PVL wurden aufgrund ihrer pathogenen Eigenschaften ausgewählt.

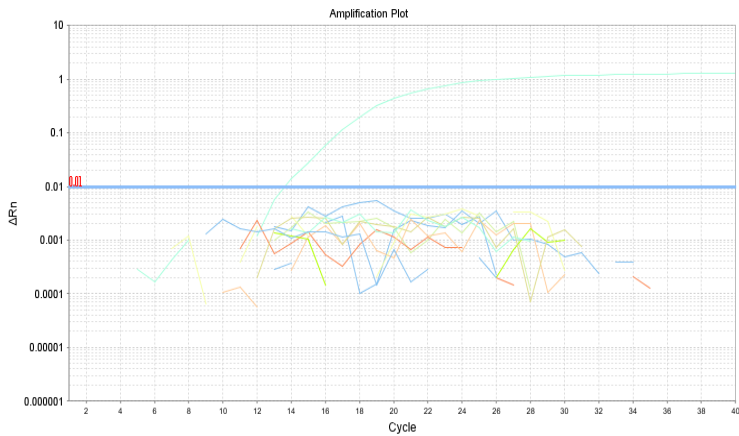
#### PVL – PCR:

In allen untersuchten *S. aureus* Isolaten konnte kein *pvl*-Gen nachgewiesen werden. EDCC 5383 wurde als Positivkontrolle genutzt und als Negativkontrollen fungierten ein *Staphylococcus carnosus* Isolat und ein Reaktionsansatz ohne *S. aureus* DNA Extrakt (Negativkontrolle Ra  $\neq$  DNA). Der Schwellenwert wurde auf 0,01  $\Delta Rn$  ( $\Delta Rn$  = Zuwachs des Fluoreszenzsignals) gelegt. Alle Fluoreszenz- oder Farbsignale über diesem Schwellenwert wurden als eindeutige Kurvenverläufe gewertet. Tabelle 9 zeigt die Messergebnisse.

**Tabelle 9: Tabellarische Darstellung des PVL-PCR Ergebnis;**

(Ct = Schwellenzyklus,  $\Delta Rn$  = Zuwachs des Fluoreszenzsignals).

Probe Name	Untersuchtes Gen	Ct Schwelle ( $\Delta Rn$ )	Ct Durchschnitt ( $\Delta Rn$ )
EDCC 5455	<i>pvl</i>	0,01	/
EDCC 5456	<i>pvl</i>	0,01	/
EDCC 5457	<i>pvl</i>	0,01	/
EDCC 5458	<i>pvl</i>	0,01	/
EDCC 5459	<i>pvl</i>	0,01	/
EDCC 5460	<i>pvl</i>	0,01	/
EDCC 5461	<i>pvl</i>	0,01	/
EDCC 5464	<i>pvl</i>	0,01	/
Positivkontrolle EDCC 5383	<i>pvl</i>	0,01	13,71
Negativkontrolle Ra $\neq$ DNA	<i>pvl</i>	0,01	/
Negativkontrolle <i>S. carnosus</i>	<i>pvl</i>	0,01	/



**Abbildung 18: Graphische Darstellung der PVL-PCR Ergebnisse;**

Die Darstellung zeigt die Kurvenverläufe der acht untersuchten Isolate, EDCC 5455, EDCC 5456, EDCC 5457, EDCC 5458, EDCC 5459, EDCC 5460, EDCC 5461, EDCC 5464, sowie die Positivkontrolle EDCC5383 und die beiden Negativkontrollen Ra ≠ DNA (Reaktionsansatz ohne *S. aureus* DNA Extrakt) und *S. carnosus*. Deutlich zu erkennen ist, dass nur der Kurvenverlauf der Positivkontrolle EDCC 5383 die Ct Schwelle (türkis gekennzeichnet) erreicht und überschreitet. In den restlichen Untersuchungsansätzen gibt es keine Amplifikation des *pvl* Gens

$\alpha$ -Hämolysin-PCR:

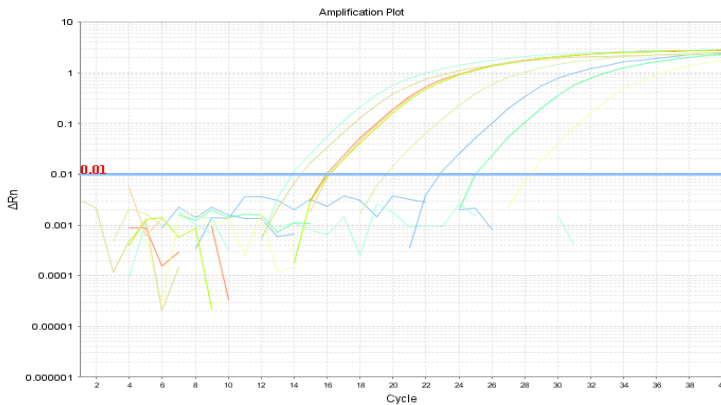
In allen untersuchten acht *S. aureus* Isolaten konnte das  $\alpha$ -Hämolysin-Gen nachgewiesen werden. EDCC 5383 wurde als Positivkontrolle genutzt und als Negativkontrollen fungierten ein *Staphylococcus carnosus* Isolat und ein Reaktionsansatz ohne *S. aureus* DNA Extrakt (Negativkontrolle Ra  $\neq$  DNA). Der Schwellenwert wurde auf 0,01  $\Delta Rn$  ( $\Delta Rn$  = Zuwachs des Floreszenzsignals) gelegt. Die Negativkontrollen erreichten den Ct Schwellenwert nicht. Tabelle 10 zeigt die Messergebnisse.

**Tabelle 10: Tabellarische Darstellung des  $\alpha$ -Hämolysin-PCR Ergebnis**

(Ct = Schwellenzyklus,  $\Delta Rn$  = Zuwachs des Floreszenzsignals).

Probe Name	Untersuchtes Gen	Ct Schwelle ( $\Delta Rn$ )	Ct Durchschnitt ( $\Delta Rn$ )
EDCC 5455	<i>hly</i>	0,01	14,51
EDCC 5456	<i>hly</i>	0,01	28,41
EDCC 5457	<i>hly</i>	0,01	16,26
EDCC 5458	<i>hly</i>	0,01	16,33
EDCC 5459	<i>hly</i>	0,01	16,04
EDCC 5460	<i>hly</i>	0,01	19,62
EDCC 5461	<i>hly</i>	0,01	25,06
EDCC 5464	<i>hly</i>	0,01	22,87
Positivkontrolle EDCC 5383	<i>hly</i>	0,01	13,95
Negativkontrolle Ra $\neq$ DNA	<i>hly</i>	0,01	/
Negativkontrolle <i>S. carnosus</i>	<i>hly</i>	0,01	/

Abbildung 19 zeigt das Ergebnis der  $\alpha$ -Hämolysin-PCR:



**Abbildung 19: Graphische Darstellung des  $\alpha$ -Hämolysin-PCR Ergebnis;**

Die Darstellung zeigt die Kurvenverläufe der acht untersuchten Isolate, EDCC 5455, EDCC 5456, EDCC 5457, EDCC 5458, EDCC 5459, EDCC 5460, EDCC 5461, EDCC 5464, sowie die Positivkontrolle EDCC5383 und die beiden Negativkontrollen Ra  $\neq$  DNA (Reaktionsansatz ohne *S. aureus* DNA Extrakt) und *S. carnosus*. Zu erkennen ist, dass neun der Kurven die Ct Schwelle erreichen und überschreiten, die acht untersuchten Isolate und die Positivkontrolle. Die Negativkontrollen können die Ct Schwelle nicht überschreiten.

### 3.6 Untersuchungsergebnisse und klinischer Verlauf

Die Einstufung der Keimvirulenz erfolgte anhand der Einteilung der Keimvirulenz in den Modellen. Diese Modelle wurden in einer Tabelle zusammengefasst um die Keime miteinander zu vergleichen. Darüber hinaus wurde die Einstufung der Virulenz mit der Schwere der Infektion des jeweiligen Patienten zusammengetragen. Insgesamt konnte ein Keim als „hoch virulent“, ein Keim als „niedrig virulent“ und sechs Keime als „intermediär virulent“ eingeteilt werden. Tabelle 11 und 12 zeigen die Einstufung.

**Tabelle 11: Einteilung der Keimvirulenz von *S. aureus*;**

EDCC 5464, EDCC 5461, EDCC 5456 und EDCC 5460 und deren klinischer Verlauf des Patienten; („-“ = niedrig virulent; „0“ = intermediär virulent; „+“ = hoch virulent; „IMN“ = intramedullärer Nagel; „POS“ = Plattenosteosynthese; „TEP“ = Totalendoprothese;)

		EDCC 5464	EDCC 5461	EDCC 5456	EDCC 5460
<b>Modelle</b>	G. <i>mellonella</i>	-	0	+	+
	<i>Osteoblasten-</i> <i>infektion</i>	-	0	0	+
	<i>Biofilm-Assay</i>	0	+	+	0
<b>Virulenzgrad</b>		niedrig	intermediär	intermediär	intermediär
<b>Infektion</b>		<b>Chronisch</b>	<b>Chronisch</b>	<b>Chronisch</b>	<b>Chronisch</b>
<b>Patient</b>	<i>Alter</i>	70	55	66	60
	<i>Geschlecht</i>	männlich	männlich	männlich	männlich
	<i>Isolationsdatum</i>	25.08.14	11.08.2014	22.12.2013	10.08.2014
	<i>Infektionsgebiet</i>	distale Fibular	proximales Femur	proximales Femur	distale Tibia
	<i>Implantattyp</i>	IMN (Tibia) / POS Fibular	IMN	Hüft-TEP	Arthrodesenagel

**Tabelle 12: Einteilung der Keimvirulenz von *S. aureus*;**

EDCC 5459, EDCC 5457, EDCC 5455 und EDCC 5458 und deren klinischer Verlauf des Patienten; („-“ = niedrig virulent; „0“ = intermediär virulent; „+“ = hoch virulent; „POS“ = Plattenosteosynthese;)

		EDCC 5459	EDCC 5457	EDCC 5455	EDCC 5458
<b>Modelle</b>	G. <i>mellonella</i>	0	0	+	+
	<i>Osteoblasten-</i> <i>infektion</i>	-	0	-	+
	<i>Biofilm-Assay</i>	0	+	0	+
<b>Virulenzgrad</b>		intermediär	intermediär	intermediär	hoch
<b>Infektion</b>		<b>Akut</b>	<b>Akut</b>	<b>Akut</b>	<b>Akut</b>
<b>Patient</b>	<i>Alter</i>	62	33	65	54
	<i>Geschlecht</i>	weiblich	männlich	männlich	männlich
	<i>Isolationsdatum</i>	12.08.2014	24.06.2014	10.10.2013	26.07.2014
	<i>Infektionsgebiet</i>	proximaler Humerus	distale Fibular	Olecranon	distales Femur
	<i>Implantattyp</i>	POS	POS	Zuggurtungs- Osteosynthese	POS

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde das Virulenzverhalten von *S. aureus* bei Implantat-assoziierten Infektionen anhand verschiedener Methoden untersucht und mit dem klinischen Verlauf der durch den jeweiligen Keim ausgelösten Infektion verglichen. Die frühzeitige Diagnostik der Keimvirulenz und des Virulenzverhalten von *S. aureus* könnte im klinischen Alltag in Zukunft eine größere Rolle einnehmen. Anhand der verschiedenen Methoden wurde eine Kategorisierung der Keimvirulenz in drei Stufen, „niedrig virulent“, „intermediär virulent“ und „hoch virulent“ vorgenommen. Die Virulenz wurde anschließend mit der klinischen Infektion verglichen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten Unterschiede im Virulenz- und Proliferationsverhalten, sowie in der Biofilmbildung und eine gute Korrelation der ermittelten Virulenzbestimmung mit dem klinischen Verlauf.

### 4.1 Infektionsmodell *Galleria mellonella*

*G. mellonella* gehört zur Familie der Pyralidae und gilt ursprünglich als Pest für Bienen und ihre Habitate, da sich die Raupen in den Bienenstöcken durch die Waben fressen und sich dort zu Faltern entwickeln. Die kleinen ca. 0,3 – 0,5g großen Raupen sind bis zu drei cm lang und weiß. Die Kosten, vom Kauf bis zur Haltung sind gering und zusätzlich bestehen keine aufwendigen ethischen Reglements für die *in-vivo* Virulenzuntersuchung von Keimen an den Gallerien (KAVANAGH K, REEVES EP 2004). Darüber hinaus ist die große Wachsmotte *Galleria mellonella* als Untersuchungsobjekt für die Virulenz von diversen Keimen ein etabliertes Verfahren. Die Haltung der Gallerien bei 37°C, die Übereinstimmung des angeborenen Immunsystems mit Phagozyten-ähnlichen Abwehrzellen und die damit einhergehende Fähigkeit zur Regeneration im Vergleich zu Säugetieren schaffen exzellente Voraussetzungen für optimale und vergleichbare Untersuchungen zur Virulenz von pathogenen Erregern (DESALERMOS A ET AL. 2012). Verschiedene Pathogene, wie bspw. *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* und *Candida albicans* wurden schon vergleichend, im Maus und *G. mellonella* Modell, auf die Virulenz untersucht und gegenübergestellt. Die Arbeitsgruppe um MUKHERJEE K ET AL. zeigte (2010), dass verschiedene *L. monocytogenes*-Stämme durch das Gallerieninfektionsmodell sensibel in ihrem Virulenzverhalten unterschieden werden konnten und diese mit Mausmodellen korrelierten. Weiterhin wurde bei einer



Virulenzuntersuchung von JANDER G ET AL. (2000) mit *P. aeruginosa* festgestellt, dass mit steigender Überlebensrate der Mäuse bei verschiedenen Stämmen, die letale Impfdosis der gleichen Stämme im Gallerienmodell gesteigert werden mussten. Somit konnte die Korrelation der Ergebnisse zu den Keimvirulenzen zwischen den Modellen gezeigt werden. In einer weiteren Studie von EVANS BA & ROZEN DE (2012) konnte gezeigt werden, dass das Gallerieninfektionsmodell geeignet ist, um die Virulenz von verschiedenen *Streptococcus pneumoniae* Stämmen differenziert zu beurteilen. Darüber hinaus war eine Korrelation zu Ergebnissen aus Kleintierversuchen gegeben.

Erstmals wurde in dieser Studie das *Galleria mellonella*-Infektionsmodell genutzt, um potentielle Unterschiede der Virulenz von *S. aureus*-Keimen bei implantat-assoziierten Infektionen zu untersuchen. Des Weiteren diente die Untersuchung zur Feststellung ob dieses Modell klinisch in den Alltag mglw. in Zukunft integrierbar ist.

### Ergebnisse

In diesem verwendeten Modell wurde das Virulenzverhalten von typisch Implantatinfektion auslösenden Keimen der Gruppe *Staphylococcus aureus* untersucht. Es wurden hierbei acht verschiedene *S. aureus* Stämme von Patienten mit implantat-assoziierten Infektion ausgewählt. Im Gegensatz zu den schon erwähnten Virulenztestungen bei Keimen wie bspw. *S. pneumoniae* oder *P. aeruginosa* ist die Virulenzuntersuchung von *S. aureus* Keimen anhand des Gallerienmodells noch nicht in hohem Maße erforscht worden. Es zeigten sich, nicht nur bei den Überlebensraten, sondern auch in der Geschwindigkeit der Larvensterblichkeit unterschiedliche Kurvenverläufe. Mit einer Überlebensrate von unter 20% innerhalb des ersten Tages p. i. kristallisierten sich die Keime EDCC 5455, EDCC 5456, EDCC 5458 und EDCC 5460 als hoch tödliche *S. aureus* Stämme heraus. Infektionen mit den Keimen EDCC 5459, und EDCC 5461 zeigten erst nach 3 bzw. 2 Tagen p.i. eine Reduktion der Überlebensrate auf unter 20% und wurden daher als „intermediär-virulent“ eingestuft. Diese Einteilung gilt ebenfalls für den Stamm EDCC 5457 welcher nach Infektion der Gallerien zur Abnahme der Überlebensrate auf 30% über den Versuchszeitraum führt. Der Stamm EDCC 5464 wurde aufgrund der geringen Sterblichkeit von ca. 10% als nicht virulent eingestuft. Hierbei stellt sich die Frage, welche Faktoren diese unterschiedlichen Ergebnisse bewirken. Das kann an der unterschiedlichen Ausprägung der Virulenzfaktoren liegen. Hierbei könnten die als hoch virulent eingestuften Stämme in dieser Studie über eine ausgeprägte Expression von *agr* assoziierten Proteinen verfügen. Das könnte eine erhöhte Expression von bspw.

Hämolysinen, wie dem  $\alpha$ -Hämolysin zufolge haben. Die Ergebnisse der PCR-Untersuchung in dieser Studie konnten bspw.  $\alpha$ -Hämolysin-DNA in allen Keimen nachweisen. Folglich sind alle Keime mit dem  $\alpha$ -Hämolysin-Gen ausgestattet. Ob das Gen eine Rolle für die Virulenz der Keime in dieser Studie spielt, ist nicht untersucht. Hierbei könnte eine reverse-transkriptase-PCR evtl. weiteren Aufschluß geben. Mglw. könnte somit die hohe Mortalität der Gallerien durch die Infektion mit EDCC 5458 erklärt werden. Ein DNA-Nachweis jedoch alleine kann nicht die Aktivität des Genes nachweisen. Diese ist durch viele Faktoren beeinflusst. Der Umstand, dass die Keime zu unterschiedlichen Zyklen die Nachweisgrenze der DNA erreicht haben, kann hierbei zudem keine Aufklärung der unterschiedlichen Virulenz liefern. Die verschiedenen Nachweisgrenzen könnten mit einem unterschiedlichen Wachstumsverhalten der Keime zusammenhängen. Für diese Studie wurden die Proben direkt von der Blutagarplatte entnommen. Es könnten schwankende Keimzahlen untersucht worden sein, wodurch die unterschiedlichen Ct-Werte erklärbar wären. Eine weitere Frage ist die Erklärung der Virulenz des einzigen MRSA-Keimes EDCC5456. Die Genstruktur der MRSA Keime gegenüber der MSSA Keime zeigen generell Verschiedenheiten. Wie auch in der Biofilmbildung könnte bei dem Keim EDCC 5456 die Expression anderer Gene zu der hohen Virulenz führen. Da nicht nur  $\alpha$ -Hämolysin für die Virulenz der Staphylokokken in Frage kommt, müssen hier andere Mechanismen gesucht werden, welche die hohe Virulenz von EDCC 5456 erklären. Es könnten  $\beta$ -Hämolysin,  $\delta$ -Hämolysin, Protein A oder auch die PVL dafür verantwortlich sein. Wie alle anderen Stämme zeigte EDCC 5456 jedoch keinen *pvl*-Gennachweis, weshalb diese Theorie nicht belegbar ist. Doch das schließt die  $\beta$ -Hämolysin,  $\delta$ -Hämolysin, Protein A Proteinproduktion nicht aus. Möglicherweise könnte auch EDCC 5456 über diese multifaktoriellen Mechanismen die hoch tödliche Virulenz entwickeln. Weiterführende Untersuchung der Arbeitsgruppe von MANNALA, KOETTITZ ET AL. 2018 zu den Keimen EDCC 5464 und EDCC 5458 zeigen, dass diese sich in ihrem Genom unterscheiden. EDCC 5458 verfügt über ein Leucocidin Gen (*lukED*). Darüberhinaus konnten mehrere Serin-Proteasen Gene (*spIF*, *spIC*, *spIB*, and *spIA*) gefunden werden. Sowohl Leukozidine als auch Serin-Proteasen sind Faktoren die zu einer hohen Virulenz eines *Staphylococcus aureus* Keimes beitragen (BOYLE-VAVRA, DAUM 2007; LINDSAY ET AL. 2017). Gerade die Poren-formende Wirkung, vereint mit Faktoren die zu einer massiven Entzündung führen, könnten eine Erklärung dafür sein, dass der Stamm EDCC 5458 gegenüber den weniger tödlichen Keimen, wie bspw. EDCC 5464 im Gallerienmodell aggressiver war. Im Vergleich zu den anderen *S. aureus* Stämmen

zeigte EDCC5464 eine annähernd 100% Überlebensrate der infizierten Larven und wurde in diesem Versuch als einziger „nicht virulenter“ Stamm klassifiziert.

Eine Möglichkeit, welche in dieser Studie nicht näher untersucht wurde, könnte die erfolgreiche Unterdrückung der Entzündung durch die Abwehrzellen der Gallerien sein. Hinzufügend wurden bei EDCC 5464 in der erwähnten veröffentlichten Untersuchung Punktmutationen nachgewiesen, welche zu einer Dysfunktion des *agr*-Gens führten. Zusätzlich fehlen diesem Stamm Serin-Proteasen. Damit ist der Keim im Vergleich zu EDCC 5458 und wahrscheinlich auch der anderen Stämme in puncto Virulenzfaktoren wahrscheinlich deutlich schwächer ausgestattet. Das Ergebnis des *Galleria mellonella* Modells kann jedoch nicht aufdecken, ob der Keim auch erfolgreich durch das Abwehrsystem bekämpft werden konnte. Es kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob noch lebende Bakterien in den Gallerien vorhanden waren, oder die Konzentration an lebenden Bakterien im Vergleich zur Infektionsdosis geschrumpft ist. Überdies könnte auch ein gezielter Mechanismus des Versteckens vor dem Immunsystem dahinterstecken. Sogenannte *small-colony-variants* von *S. aureus* Stämmen zeichnen sich durch eine verminderte Produktion von bspw. hämolytischen Virulenzfaktoren und reduzierte metabolische Aktivität aus. Dadurch entkommen diese Varianten dem Immunsystem und sind resistenter gegenüber Antibiotika (FRAUNHOLZ & SINHA 2012).

Die Virulenz der *S. aureus* Stämme im *Galleria mellonella* Modell zeigte ein heterogenes Muster. Die deutlichste Divergenz zeigte sich zwischen den hoch virulenten Keimen EDCC 5455, EDCC 5456, EDCC 5458 und EDCC 5460 und dem einzigen als niedrig virulent eingestuften Keim EDCC 5464. Die Infektionsdosis von  $1 \times 10^6$  CFU pro Wachsmottenlarve stellte sich als angemessen zur Evaluation des Virulenzverhalten von *S. aureus* heraus. Weiterführende Untersuchungen mit größeren Keimzahlen könnten eine breitere Kategorisierung der Virulenz von *S. aureus* Keimen ermöglichen. Hierbei sollten zusätzliche ergänzende Untersuchungen, wie bspw. die PCR-Genanalyse von Virulenzfaktoren oder Biofilm-bildenden Faktoren durchgeführt werden, um ein detaillierteres Bild der Virulenz von *S. aureus* zu erhalten.

### Methode

Um die bestmögliche Ergebnisgenauigkeit zu erhalten wurden nur Raupen vom gleichen Größen- und Gewichtstyp ausgewählt. Nach der Injektion erfolgte die tägliche Begutachtung der Raupen nach jeweils 24 Stunden. Hierbei wurde unter äußerster Vorsicht die Überlebensfähigkeit der Larven begutachtet. Die drei unabhängigen

Untersuchungen eines jeden Keimes wurden zusammengefasst in eine prozentuale Überlebenskurve und mit den anderen Keimen verglichen. Diese Methodik wurde, wie durch MUKHERJEE K ET AL. (2010) oder PURVES J ET AL. (2010) beschrieben, gewählt. Eine andere Möglichkeit wäre das Auswerten der Ergebnisse über die logarithmische Phase. Hierbei wird die letale Dosis von 50% gewählt. Somit wird auf einem Diagramm ausgewertet inwieweit ein tödlicher Effekt der Virulenz auf 50% der Population zutrifft (RAMARAO N ET AL. (2012); JANDER G ET AL. (2000).). Letztendlich ist die Qualität der Auswertung durch beide Verfahren gleichermaßen gewährleistet und kann somit individuell gewählt werden.

Im Allgemeinen zeigt das *Galleria mellonella* Infektionsmodell, dass eine signifikante und zuverlässige Virulenzuntersuchung von Keimen möglich ist. Weiterhin stellt sich das Verfahren als unkompliziert und besonders kostengünstig im Vergleich zu Säugetiermodellen dar. Wie schon durch Studien als Beispiel dargelegt, konnten gleichwertige Ergebnisse zu Maus- und Rattenversuchen belegt werden (BRENNAN ET AL. 2002; MUKHERJEE ET AL. 2010). In der bestehenden Literatur sind jedoch kaum Untersuchungen mit dem Modell *Galleria mellonella* in Bezug auf Implantat-assoziierte Infektionen und Erregerdiagnostik zu finden. Deshalb muss die Anwendung dieses Verfahrens, wenn es um die Virulenztestung von *S. aureus* bei Implantat-assoziierten Infektionen geht, als Pilotprojekt bezeichnet werden. Kleintiermodelle haben sich in Bezug auf periprotetische Infektionen und Implantat-assoziierte Infekte etabliert. Die Untersuchungen dienen jedoch nicht primär der Evaluation des Virulenzverhaltens von Keimen, sondern vielmehr zum Zwecke der Entwicklung von Therapiemöglichkeiten. Hierzu werden Tiermodelle entwickelt, welche operative unfallchirurgische oder orthopädische Prozeduren imitieren. Beispielsweise untersuchten VARRONE ET AL. (2014) inwieweit der 1C11-Antikörper der Maus gegen *S. aureus* Infektionen wirksam ist. Dazu wurde die Knocheninfektion als Vollbild in der Kontrollgruppe gezeigt. Es wurden drei *S. aureus* Stämme verwendet. Der Verlauf einer *S. aureus* induzierten Infektion wurde zwar dargestellt, jedoch keine Differenzierungen zwischen den drei verschiedenen Keimen erstellt. In einer anderen Studie wurden die radiologischen Zeichen einer Implantat-assoziierten Knocheninfektion untersucht. Hierbei wurden 46 weiße Neuseeland-Kaninchen mit einem *S. aureus* Stamm in unterschiedlichen Konzentrationen infiziert, nachdem diese ein extramedulläres Implantat erhalten hatten. Gewertet durch ein entwickeltes Scoresystem, resultierten schon bei nur diesem *S. aureus* Keim in verschiedenen Konzentrationen unterschiedliche klinische Ausprägungen der Infektion von mild bis sehr stark (KRAFT ET AL. 2001). Daraus kann

man schließen, dass schon die kleinste Varianz der Konzentration eines beliebigen Keimes im Tiermodell zu unterschiedlichen Ausprägungen einer Infektion führen kann. ALT ET AL. 2014 untersuchten den Effekt von Rifampicin-Fosfomycin beschichteten Prothesen in einem Kaninchenmodell. Hierbei wurden MSSA und MRSA Keime in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Erkennbar wurde, dass trotz unterschiedlicher Konzentrationen der Keime in den Kontrollgruppen mit unbeschichteten Implantaten eine fulminante Infektion entstand. Diese Untersuchung zeigt, dass schon ein beliebiger *Staphylococcus* Keim generell ein heterogenes Muster an Infektionen zeigen kann. Das Gallerienmodell ist diesen Schwankungen weit weniger unterlegen. Zu niedrige Injektionskonzentrationen führen zum Überleben aller Versuchsräupen, wohingegen zu hohe Injektionskonzentrationen zum Sterben aller Räupen führt. Für eine rasche und effektive Methode zum Diagnostizieren von Virulenzverhalten von *S. aureus* Keimen könnte das Gallerien-Modell möglicherweise nicht nur im Forschungsbereich, sondern auch im klinischen Alltag vorteilhaft sein. Untersuchungen zu komplexerer Immunreaktionen und langfristige Infektverläufe können in den Insektenmodellen hingegen nicht durchgeführt werden. Zusätzlich bieten Kleinsäuger-Tiermodelle, wie bspw. Kaninchenversuche aufgrund der Möglichkeit des Einbringens der Fixierung von Platten, Schrauben und intramedullären Nägeln ein vergleichbares Modell zu humanen Implantatinfektionen.

Grundsätzlich muss vor einer Untersuchung die Frage gestellt werden, was untersucht werden möchte, entweder die Infektsituation mit chirurgischen Verfahren, oder die Virulenz des den Infekt auslösenden Keimes. Letzteres kann reliabel und ohne Vorbehalt durch das Gallerien-Modell untersucht werden, auch wenn diese Untersuchung bezogen auf Implantat-assoziierte *S. aureus* Infektionen noch nicht häufig angewendet wurde.

#### **4.2 Osteoblasteninvasionsmodell**

Seit längerem etabliert sich die Internalisierungsfähigkeit in Wirtszellen von Staphylokokken als Forschungsansatz. Frühere Untersuchungen zeigten, dass nicht nur Osteoblasten, sondern auch Rinder-milchdrüsen-Epithelzellen und humane Endothelzellen von der Internalisierung betroffen sind (Almeida ET AL. 1996, Beekhuizen ET AL. 1997, Schröder ET AL. 2006). Der Prozess der Aufnahme des Bakteriums in eine lebende Zelle scheint dabei auf mehrere Wege zu funktionieren. In den zahlreichen Studien zur Osteoblasteninvasivität der Keime konnten

unterschiedliche Pfade aufgedeckt werden (ELLINGTON JK ET AL. 1999; MOHAMED W ET AL. 2014).

### Ergebnisse:

Der Vorversuch des Osteoblasteninfektions-Assay diente zur Untersuchung der Invasivität von *S. aureus* Keimen, welche typische Implantat-assoziierte Infektionen auslösten. Der Hauptversuch zeigte dann zusätzlich das intrazelluläre Wachstum.

Untersuchungen zur Invasivität nach 1h Infektion zeigten, dass die Keime unterschiedlich stark in der Lage waren, in die Zellen zu invadieren. Hierbei hob sich der Keim EDCC 5458 mit knapp über 10% verbliebener Bakterienkonzentration der Infektionsdosis von den anderen Keimen ab. Der nachfolgend invasivste Keim EDCC 5457 konnte mit 4,24% der Infektionsdosis nicht annähernd die Invasivität vorweisen. EDCC 5464 zeigte eine niedrige Infektionsdosis von 2,58%. Die restlichen Keime pendelten sich unter diesem Niveau ein, wobei sich die Keime EDCC 5455, EDCC 5456 und EDCC 5460 als am schwächsten invasiv mit unter einem 1% der Infektionsdosis nach einer Stunde zeigten. Somit zeigte sich auch der MRSA Keim EDCC 5456 überraschenderweise als schwach invasiv. Da die Genausstattung von MSSA und MRSA Keimen Unterschiede aufweist, könnte hier eine Mutation oder andere exprimierte Proteine die Invasionsfunktionalität beeinträchtigen. WERBICK ET AL. (2007) zeigten eine negative Korrelation der Invasionsfähigkeit von MRSA Stämmen mit dem Vorhandensein des Gens *p/s*, welches für das Oberflächenprotein plasmid-sensitiv surface protein codiert. So verfügten *p/s*-positive MRSA Stämme über eine verminderte Invasionsfähigkeit gegenüber *p/s*-negativen Stämmen in humanen embryonalen Nierenzellen. Darüber hinaus konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Ausstattung der MRSA-Keime mit bestimmten staphylococcal chromosomal cassette *mec* (*SCCmec*) Genen einen Einfluss auf die Invasivität hat. Möglicherweise könnten auch bei dem Keim EDCC 5456 diese Faktoren zu einer geringen Invasivität geführt haben. Bei den MSSA Keimen könnten die Unterschiede in der verschiedenen Ausprägung von bspw. *MSCRAMM* Proteinen, wie *fnBP*, Fibrinogen-bindenden Proteinen oder die Konzentration von *Protein A* eine Rolle gespielt haben. Protein A bindet bspw. direkt an Osteoblasten, kann die Proliferation der Zellen verhindern und über den *TNFR-1* die Zellen invadieren (CLARO ET AL. 2011). Somit könnte man davon ausgehen, dass die niedrig invasiven Keime über eine geringere Ausstattung solcher Proteine verfügen. Zudem könnten auch die unterschiedliche Regulierung von Virulenzfaktoren, die zu einer Hochregulierung von Oberflächenproteinen bei Wirtszellen führen ein möglicher Grund für die unterschiedliche Invasionsfähigkeit sein.

Ein weiterer Versuch untersuchte das intrazelluläre Wachstum der getesteten Keime. In dieser Studie wurden die Keime daran gewertet, welche einen raschen Anstieg der intrazellulären Keimkonzentration innerhalb von sieben Stunden p. i. und einen starken Abfall der Keimkonzentration nach 23 Stunden zeigten. Diese Kategorisierung wurde anhand der Studie von MOHAMED ET AL. (2014) vorgenommen. Letztendlich zeigten nur die Keime EDCC 5460 und EDCC 5458 ein solches Verhalten, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung, und wurden somit als „hoch virulent“ eingestuft. Den markantesten Kurvenverlauf zeigte hierbei EDCC 5458. Drei Stämme, EDCC 5456, EDCC 5457 und EDCC 5461 wurden als „intermediär virulent“ eingestuft, da die Kurvenverläufe gegensätzlich zu den „hoch virulenten“ Keimen ein kontinuierliches, intrazelluläres Bakterienwachstum aufwiesen. EDCC 5455, EDCC 5459 und EDCC 5464 wurden als „niedrig virulent“ eingestuft, da kein Konzentrationszuwachs oder massiver Abfall zu verzeichnen war.

Doch wie kommt ein Konzentrationsabfall der intrazellulär befindlichen Bakterien zustande? Laut MOHAMED ET AL. (2014) und ALEXANDER ET AL. (2001) liegt die Antwort in der *S. aureus* induzierten Apoptose. Um den Verdacht der Apoptose nachzugehen, wurde in dieser Studie die Viabilität der infizierten Zellen mittels MTT Assay untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die mit EDCC 5458 und EDCC 5460 infizierten Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle einen 30-40%igen Abfall der Viabilität zeigten. Allen voran zum Zeitpunkt von 23h zeigte sich der Unterschied zwischen den keimbelasteten Zellen und der Negativkontrolle. Im Hinblick auf die Invasionsfähigkeit von EDCC 5458 nach einer Stunde, könnte also auch die Fähigkeit zur Apoptose-Induktion ein Mechanismus sein, um nach ca. 23h neue Zellen zu invadieren. Im Gegensatz dazu zeigen die mit EDCC 5464 und EDCC 5455 infizierten Zelllinien jedoch einen positiven Wachstumstrend, welcher am deutlichsten nach 23h zu verzeichnen ist. Dass diese beiden Keime auch im 1h Assay wenig invasiv sind, stützt die gewählte Kategorisierung der Keime in dieser Methode. Eine reduzierte Viabilität infizierter Zellen könnte ein Zeichen für induzierte Apoptose sein, was wiederum eine Erklärung für eine Abnahme der intrazellulären Bakterienanzahl sein könnte. Eine Abnahme lebender Wirtszellen würde mit einer Abnahme der Anzahl intrazellulärer Bakterien korrelieren. Der MTT-Assay unterscheidet nicht zwischen Apoptose und Nekrose, daher ist nicht auszuschließen, dass auch Nekrose für ein Absterben der Zellen verantwortlich ist. Die Studie von ESSMANN ET AL. (2003) konnte die Zellnekrose von mit *S. aureus* infizierten Zellen trotz Aktivierung des Caspase-Weges darlegen. Verantwortlich für die Nekrose war das  $\alpha$ -Toxin der Staphylokokken. Der Konzentrationsabfall nach 23h der als „hoch virulent“ eingestuften Keime EDCC 5458 und EDCC 5460 in den SAOS2-

Zellen könnte somit auch möglicherweise durch Zellnekrose erklärt werden. Hierzu müsste die Konzentration des  $\alpha$ -Toxin-Gens aller acht Keime analysiert werden. In einer solchen weiterführenden Untersuchung könnte sich womöglich im Vergleich zum bspw. als „niedrig virulent“ eingestuften EDCC 5464 ein Unterschied in der Genkonzentration herausstellen. Ein weiterer Grund für einen Abfall der intrazellulären Bakterienanzahl unabhängig von der Viabilität der Wirtszellen könnte auch eine Eliminierung der Bakterien durch Autophagie sein. Die Autophagie von Zellen wird ausgelöst, wenn bspw. ein intrazellulärer pathogener Keim bestimmte Merkmale zu erkennen gibt, welche die infizierten Zellen als fremd erkennen. Das *agr*-Gen und die damit einhergehenden Toxine der *S. aureus* Spezies sind ein solches Erkennungsmerkmal. In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Produktion von  $\alpha$ -Hly entscheidend zur Auslösung der Autophagie von *S. aureus* infizierten Zellen beiträgt (MESTRE ET AL. 2010). Der rapide Abfall der Bakterienkonzentration von EDCC 5458 und EDCC 5460 könnte sich also auch durch eine Autophagie der SAOS2-Zellen erklären. Zudem zeigt der Keim EDCC 5455 eine ähnliche Tendenz, wenn auch der Konzentrationsunterschied des Keimes zwischen 3,5-23h nicht so stark zu sehen ist. Weiterhin könnte dieses Phänomen auch die geringeren Konzentrationsverluste von bspw. EDCC 5464 und EDCC 5460 erklären.

Zusammenfassend zeigte sich in diesem Modell, dass die Virulenz der *S. aureus* Stämme in Bezug auf die Invasivität multifaktoriell betrachtet werden muss. Die verschiedenen Mechanismen, welche zum Tod infizierter Zellen führen können, zeigen die komplexe Interaktion der Staphylokokken mit den Wirtszellen. Dennoch zeigten sich klare Unterschiede im Verhalten der Bakterien. Hierbei konnten verschiedene Virulenztypen differenziert werden. Letzten Endes entscheidet sich die Virulenz eines Keimes nicht nur aus einem Mechanismus. Es zeigte sich, dass manche der hier untersuchten *S. aureus* Stämme gegenüber den anderen Stämmen eine stärkere Fähigkeit zu invadieren und proliferieren besitzen. Frühere Untersuchungen in der Literatur geben zusätzlich Hinweise, dass die Osteoblasteninvasivität für eine unfallchirurgische Implantatinfektion, oder orthopädische periprothetische Infektion eine wichtige Rolle spielen. Klinisch könnte sich, durch eine verbesserte und schnelle Diagnostik im Hinblick auf die Invasionsfähigkeit der Keime, die darauffolgende Therapieentscheidung evtl. differenzierter und individueller gestalten.



Method:

Das hier verwendete und etablierte Osteoblasteninvasions-Assay (MOHAMED W ET AL. 2014) sollte Aufschluss über Unterschiede im Invasions- und Proliferationsverhalten von acht unterschiedlichen *S. aureus* Stämmen geben, welche Implantat-assoziierte Infektionen auslösten. Für diese Methode wurde die humane Osteosarkom-Zelllinie SAOS-2 Zelllinie genutzt. Diese wurde erstmals durch FOGH ET AL. (1977) in einer Veröffentlichung erwähnt und später einhergehend auf die Vergleichbarkeit mit normalen Osteoblasten überprüft. Hierzu wurde die Fähigkeit zur Bildung einer mineralisierten Matrix getestet, die Existenz von wichtigen osteoblastischen Faktoren ermittelt und die Interaktion mit der Umgebung untersucht. Es stellte sich heraus, dass diese Eigenschaften bei der Zelllinie vorhanden waren und darüber hinaus die Tumoreigenschaften, wie wiederkehrendes Wachstum und Stabilität unter verschiedenen Umweltbedingungen (RODAN ET AL. 1987). Somit erfüllte die SAOS-2 Zelllinie auch für diese Untersuchung alle Kriterien, um die Unterschiede des Invasionsverhaltens heraus zu kristallisieren. In anderen Studien wurden, verglichen mit der hier verwendeten MOI = 30, höhere MOI-Konzentrationen verwendet. Eine höhere MOI zeigte jedoch keine stärkere oder deutliche Infektion, wobei natürlich die Wahrscheinlichkeit für eine Infektion steigt. Die Unterschiede in Bezug auf die Inkubationszeiten zeigten sich marginal (REILLY ET AL. 2000; TUCKER ET AL. 2000; HAMZA ET AL. 2011). Beeinflussend wirkt sich zudem auch die Menge des Mediums aus, in welcher sich die zu infizierende Zellschicht befindet. Hierbei kann sich die Infektionsdosis noch einmal verschieben (SHABRAM P, AGUILAR-CORDOVA E 2000).

Der Mediumwechsel mit der Zugabe von 30µg/ml Gentamycin nach 30 min Infektionszeit sollte noch extrazelluläre vorhandene Bakterien abtöten und die alleinige Beurteilung der schon in die Zellen invadierten Bakterien ermöglichen. Die Konzentration von 30µg/ml Gentamycin wurde hier bewusst verwendet, da vorherige Versuche zeigten, dass Gentamycin-Konzentrationen um die 100µg/ml möglicherweise durch Endozytose schon intrazellulär gängig waren und somit die dort befindlichen Bakterien abtöten konnte (MOHAMED W ET AL. 2014). Alle Stämme wurden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Gentamycin zuvor getestet.

Der Umstand, dass mit lebenden Organismen kein exaktes und immer stabil-gleichwertiges Wachstum trotz konsequent eingehaltener Methodik und Protokolle möglich ist, zeigt sich auch in den unterschiedlichen Abweichungen der Keime zueinander. Diese Schwankungen waren jedoch mit einkalkuliert und nicht massiv beeinträchtigend. Die Heterogenität der Wachstumsverläufe und der Zeitpunkte der

Konzentrationsabfälle der intrazellulär lebenden Staphylokokken könnte Hinweise auf die Entstehung und unterschiedlichen Verläufe der klinischen Implantatinfektionen geben. Die Vielzahl der *in-vitro* gewonnenen Ergebnisse müssten in entsprechenden *in-vivo* Modellen flächendeckend bestätigt werden. Die entwickelten *in-vitro* Infektionsmodelle sind dabei nicht einfach auf lebendige Organismen kopierbar und sollten somit für *in-vivo* Experimente angepasst werden (JOSSE ET AL. 2015). Weiterführende, komplexere *in-vivo* Untersuchungen sollten zum besseren Verständnis der *S. aureus* Invasionsfähigkeit folgen.

#### 4.3 Biofilm-Assay

Die Biofilmbildung als Virulenzfaktor spielt bei den unfallchirurgischen und orthopädischen Implantatinfektionen und Osteomyelitiden eine wesentliche Rolle (METSEMAKERS ET AL. 2016). Aufgrund zahlreicher Komplikationen und Hindernisse in der Behandlung von Biofilm-assoziierten Infektionen ist die Biofilmbildung ein zentraler Untersuchungsaspekt in der unfallchirurgisch-orthopädischen Forschung. Darüber hinaus stellt diese Thematik in der gesamten Medizin eine Herausforderung dar. So formieren sich z. Bsp. Biofilme an Kathetern aus Plastik, welche in der Inneren Medizin verwendet werden (PETRELLI ET AL. 2008). Neben *S. aureus* sind andere Keime, wie bspw. *Pseudomonas aeruginosa*, Enterokokken oder Koagulase-negative Staphylokokken in der Lage, Biofilme zu bilden. In der Chirurgie, allen voran in der Unfallchirurgie und Orthopädie, spielen jedoch die Staphylokokken die Hauptrolle. Im klinischen Alltag finden sich in über der Hälfte der Fälle Staphylokokken bei Implantat-assoziierten Infektionen, davon ca. 30% *S. aureus* (CAMPOCCIA D ET AL. 2006). Die Biofilmbildung der *S. aureus* Keime ist ein von vielen Faktoren abhängiger Prozess mit Beteiligung von multiplen Matrixkomponenten. Steifes Fremdmaterial aus Metall oder Plastik, welches naturgemäß keine Abwehrmöglichkeit besitzt, ermöglicht den Bakterien eine gute und sichere Haftung, sowie eine gute Ausgangslage zur Biofilmproduktion als Schutz vor antibiotischer Therapie. Gleichermassen können Bakterien sogar lokal wirksame antibiotikahaltige Spacer befallen und zusätzlich auch noch zur Resistenzbildung gegen Antibiotika führen. Blut- und Plasmaproteine, Matrixmoleküle, wie Fibrinogen, Fibronectin und Kollagen lagern sich an die Implantate und wirken hierbei als Brücken für die Kolonialisierung der Oberfläche. Zeigt sich die Biofilmbildung im Endstadium, bleibt meist nur noch die Möglichkeit der radikalen Entfernung des Implantats mit Wund- und Gewebedebridement (WAGNER ET AL. 2011; DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ENDOPROTHETIK 2010).

Ergebnisse:

Die Ergebnisse in der Biofilmuntersuchung zeigten, dass Unterschiede in der quantitativen Biofilmbildung von *S. aureus* Keimen bestehen. Vier der Keime, EDCC 5456, EDCC 5457, EDCC 5458 und EDCC 5461 wurden als „stark adhärent“ klassifiziert. Die restlichen *S. aureus* Stämme zeigten sich als „mäßig adhärent“. Das demonstriert, dass schon in einer kurzen Untersuchungsphase einige Stämme rascher Biofilm bilden können als andere Stämme. Genetische Faktoren spielen dabei wahrscheinlich eine tragende Rolle. Zudem kann das Bakterium nur mithilfe wirtseigener Proteine wie Fibronektin, Fibrinogen und einem feinen Aktinzytoskelett die Prothesenfremdkörper befallen. Das heißt, dass die Biofilmbildung aus multifaktoriellen Begebenheiten entsteht. Staphylokokken können über PIA *icaADBC*-abhängige und *icaADBC*-unabhängige Biofilme bilden. Mit der zweiten Biofilmvariante werden Proteine, wie SasG, Bap und Aap in Verbindung gebracht. Über diese Proteine besteht dann ein direkter Zell-Zell-Kontakt (ROHDE ET AL. 2007). Möglicherweise zeigen die starken Biofilmbildner, wie bspw. EDCC 5458 eine erhöhte Expressionsrate von *icaADBC*-Genen und setzen sich so von den „intermediär adhären“ *S. aureus* Stämmen ab. Eine andere Erklärung für die Biofilmaktivität könnte das *agr*-Gen sein, da auch dieses Gen neben der Produktion von Virulenztoxinen auch mit der Biofilmbildung assoziiert ist. Eine Expression des *agr*-Gens wurde in dieser Studie nicht untersucht. Ob die unterschiedliche Biofilmfähigkeit der *S. aureus* Keime in dieser Studie mit einer Aktivität des *agr*-Gens zusammenhängen, müsste über weiterführende Untersuchungen aufgeklärt werden. Andere Mechanismen für die Biofilmbildung könnten somit in dieser Studie ebenfalls entscheidend sein. Aufgrund dessen ist das Verständnis der Biofilmbildung aktueller Forschungsgegenstand. Momentan jedoch ist der Auslösemechanismus der Biofilmproduktion für die mögliche Therapiestrategie nicht relevant, da noch keine effektiven Gentherapien zur Biofilmbildung zur Verfügung stehen. Die schnelle effektive Erkennung von Biofilm-aktiven Keimstämmen war deshalb in dieser Studie vorrangig. Eine Infektion mit einem Keim wie EDCC 5458, ein starker Biofilmbildner, welcher sich schon in den anderen Methoden als hoch virulent dargestellt hat, könnte grundsätzlich einer anderen Therapiestrategie unterstellt werden, als eine Infektion eines gering Biofilm-bildendem Stamm. So könnte z. B. ein Keim wie EDCC 5464, ein mäßig adhärenter gering Biofilm-bildender Keim, sensibel für eine große Bandbreite an Antibiotika, bei stabilem Implantat und ohne Wundfistel nach dem Konzept von ZIMMERLI & SENDI (2011) durch eine gezielte Antibiotikatherapie mit ausgiebigem Debridement und Prothesenerhalt behandelt werden. Zeigt sich ein Keim, wie EDCC 5458 als schwierig zu behandeln, akut

aggressiv oder *Methicillin-resistent*, müsste laut ZIMMERLI & SENDI (2011) eine Zwei-Phasen-Revisionstherapie angestrebt werden. Diese ist sicherlich weitaus invasiver und langwieriger. Zudem müsste somit die Prothese entfernt werden und eine vorübergehende Instabilität des Patienten wäre die Folge. Die schnelle und verlässliche klinische Diagnostik der Biofilmbildung in der frühen Infektionsphase könnte die Therapieentscheidungen mglw. individuell anpassungsfähiger machen.

Im Ganzen konnte in dieser Studie in puncto der Biofilmbildung Disparitäten innerhalb der Spezies *S. aureus* aufgezeigt werden. Ziel war es innerhalb von kurzer Zeit, möglichst effektiv die Biofilmbildung der Stämme abzubilden. Zwei der vier starken Biofilmbildner EDCC 5457 und EDCC 5458 zeigten dabei ein akutes klinisches Krankheitsbild der Patienten. *S. aureus* EDCC 5461 und EDCC 5457 hingegen ein chronisches Krankheitsbild der Patienten. Weitere Untersuchungen zum Verständnis der Biofilmbildung sind nötig. Aufgrund der zeitlichen Komponente werden Biofilm-assoziierte Infektionen häufig einem chronischen „low grade“ Krankheitsbild zugerechnet (BORENS & HELMY 2016). Die Ergebnisse dieser Studie zeigten dennoch, dass auch „high grade“ Infektionsstämme in der beginnenden Infektionsphase zur Biofilmbildung fähig sind. Die Beschaffenheit des Biofilms könnte dabei eher unausgereift sein, aber trotzdem zu einer verbesserten Invasivität des Keimes beitragen. Folgestudien mit größeren Fallzahlen könnten weitere Aufschlüsse liefern.

#### Methode:

Aufgrund der großen Bedeutung für die septische Chirurgie wird durch verschiedene Methoden versucht, die Biofilmbildung quantitativ und qualitativ zu untersuchen. Hierbei werden Methoden der Farbmessung, per Elektronenmikroskop mit Fluoreszenzfärbung oder über die metabolische Aktivität verwendet.

TOTÉ K ET AL. (2008) berichten von einer Methode der Biofilmquantifizierung durch DMMA-Resazurin Färbung (Dimethyl Methylen Blau). DMMA dient ursprünglich zur Quantifizierung von Glykosaminoglykanen, welche eine starke Strukturähnlichkeit zum *polysaccharide intracellular adhesin* (PIA) aufweisen. PIA-abhängige Biofilme können somit durch eine schnelle Methode spezifisch nachgewiesen werden, ein Vorteil bspw. gegenüber Kristallviolett-Färbung, welche jede Komponente der Matrix unspezifisch färbt. Zudem wurde diese Technik auch schon für andere Keimarten, wie *E. coli* verwendet. Eine weitere Methode, stellt die Kristallviolett (CV)-Färbungsmethode dar. Hierbei werden lebende, als auch tote Bakterien gefärbt. Der Vorteil ist die günstige, schnelle Reproduzierbarkeit zur Darstellung von Biofilmen. Zudem können mehrere

Proben gleichzeitig untersucht werden. Verglichen mit der Epifluoreszenz-Mikroskopie konnten keine maßgeblichen Unterschiede in der Detektion von Biofilmen gezeigt werden (DJORDJEVIC ET AL. 2002). Ein Defizit besteht in der nicht möglichen Unterscheidung zwischen lebenden und nicht-lebenden Bakterien, sowie der Bestandteile der Biofilmmatrix. Hierbei kann keine Angabe über die Vitalität der Zellen gemacht werden. Eine zusätzliche Technik stellt die LIVE/DEAD Färbung mit dem Konfokalmikroskop dar. Bei dieser Technik werden lebende und abgestorbene Bakterienzellen gefärbt. Hierbei werden zwei unterschiedliche DNA-bindende Fluoreszenz-Farbstoffe auf die Bakterienzellen gegeben. Syto9 penetriert die lebenden und toten Bakterienzellen, Propidiumiodid hingegen nur die abgestorbenen Bakterienzellen. Nachteilig an dieser Methode ist, dass sobald die Zellmembran beschädigt ist, eine Zelle als Tod gewertet wird, ohne die metabolische Aktivität zu beachten. Zudem muss natürlich der Zeitaufwand mit eingerechnet werden. Um reliabel, aber auch zügig die Biofilmbildung nachweisen zu können, müsste diese Technik im Verfahren kürzer werden. Nichtsdestotrotz stellt diese Methode reproduzierbar quantitativ Biofilme dar und zeigt somit die Biofilmformation (DOLL ET AL. 2016). Eine weitere Biofilmdetektionsmethode stellt der Ultraschall mit anschließender CFU-Auszählung dar. Orthopädische und unfallchirurgische Implantate werden im Labor per Ultraschall behandelt, um die fest haftenden Bakterien zu lösen und auszählen zu können. TRAMPUZ ET AL. (2007) verglichen diese Untersuchung mit konventionellen Methoden, wie dem Bakterienwachstum durch entnommene Synovialflüssigkeit des Patienten auf ein Kulturmedium. Hierbei erwiesen sich die mit Ultraschall behandelten Proben als wesentlich empfindlicher. Nachteilig ist hier der enorme Zeitaufwand zur Detektion. Zudem können nur bestimmte Prothesenteile mit passender Größe per Ultraschall untersucht werden. Hinzu kommt, dass die Frequenz und die Zeit des Ultraschalls exakt eingestellt sein müssen, um ein gutes Ergebnis zu erzielen. Eine andere Technik zur Biofilmdetektion stellt die Atomkraftmikroskopie (AFM) dar. Sowohl einzelne bakterielle Zellen, als auch die Biofilmformation einer Bakterienkolonie können detailliert in trockenem oder hydriertem Zustand dargestellt werden. Zudem wird dieses Verfahren zur Entschlüsselung und zur Kartierung von Wechselwirkungen der Biofilmmatrix im Nanometerbereich genutzt. Diese können sogar ggf. dreidimensional rekonstruiert werden. Weitere Vorteile des Verfahrens sind die „Nicht-Invasivität“, keine Notwendigkeit zur Färbung und keine zusätzliche Aufarbeitung zur Darstellung, auch im „in-vivo“ Zustand. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die fehlende Möglichkeit zwischen lebenden und toten Bakterien zu unterscheiden. Darüber hinaus ist dieses Verfahren sehr zeitaufwendig und ist somit

für eine rasche und qualitative Diagnostik nicht geeignet (werden (KATSIKOIANNI M, MISSIRLIS YF 2004; RIBEIRO ET AL. 2012).

In dieser Studie wurde die Biofilmdetektion mit CV-Färbung verwendet. Mit dieser Methode kann die Biofilmbestimmung innerhalb von 3 Tagen vorgenommen werden. Zudem zeigten die Ergebnisse klare Unterschiede im Wachstum. Da prinzipiell die Adhärenzfähigkeit der Bakterien getestet wurde, um die Biofilmbildung zu zeigen, kann mit dieser Methode die Frühphase der Biofilmbildung von Keimen dargestellt werden. Die Langzeit-Beobachtung des Biofilmwachstums kann mit diesem gewählten kurzen Zeitraum nicht gewährleistet werden. Niedrig virulente Keime wie *Staphylococcus epidermidis*, welche eher verzögerte Infektionen in einem Zeitraum von zwei bis zehn Wochen auslösen und einen Biofilm sehr langsam bilden (METSEMAKERS ET AL. 2016), könnten somit dennoch frühzeitig im *in-vitro* Versuch anhand der möglichen Biofilmbildung getestet werden. Dennoch kann das Experiment keine *in-vivo* Verhaltensweisen prognostizieren, sondern nur eine mögliche Abschätzung zur Biofilmbildung geben. Nichtsdestotrotz kann der Nachweis unterschiedlicher Werte der untersuchten *S. aureus* Stämme für die klinische Diagnostik wichtig sein. Ein Keim mit wenig gebildetem, unreifem Biofilm, nur knapp über der Nachweisgrenze könnte somit schneller und evtl. auch weniger invasiv, noch frühzeitig schonender und Implantat erhaltend behandelt werden. Wäre die Biofilmbildung eines Keimes *in-vitro* schon in starkem Ausmaß fortgeschritten, könnte man von einem virulenten Keim ausgehen und müsste somit evtl. direkt radikalere Therapiestrategien erwägen. Ein vollständig ausgereifter Biofilm führt bei jeder Infektion im Körper zu massiven Komplikationen und muss somit bestenfalls in sehr frühem Stadium erkannt werden können. Die Ergebnisse zeigten, dass sogar innerhalb einer Spezies die Geschwindigkeit der Biofilmbildung *in-vitro* variiert. Es bleibt die Frage, ob das Verhalten des Keimes in einem *in-vivo* Experiment ein ähnliches Verhalten zeigt. Diesbezüglich müsste die Bakterienstammzahl in Folgeversuchen erhöht werden und mit *in-vivo* Experimenten verglichen werden.

#### 4.4 Vergleich Studienergebnisse mit klinischem Verlauf

Nach Auswertung der Ergebnisse dieser Studie erfolgte der Vergleich mit den klinischen Verläufen der Patienten. Entscheidend waren hohe Differenzen der CRP-Werte der klinischen Verläufe zueinander. Generell zeigten die als „intermediär“ eingestuft Keime eine Diversität der Virulenz innerhalb der Modelle. Zeigte ein Keim eine weniger ausgeprägte Biofilmbildung, wie bspw. EDCC 5460, so wies derselbe

Keim eine ausgeprägte Virulenz im Gallerienmodell auf. Im klinischen Bild zeigte die implantat-assoziierte Infektion durch diesen Keim eine akute Infektion. Diese wurde mit Blick auf den erhöhten CRP-Wert bei Diagnosestellung von 238 mg/ml bestätigt. Insgesamt zeigten die als „intermediär“ eingestuft Keime eine Heterogenität in der Virulenz bei Betrachtung der Modelle. Im Vergleich zum klinischen Verlauf konnten diese Stämme sowohl eine akute, als auch eine chronische Infektion auslösen. Somit spiegelte sich die Heterogenität der „intermediären“ Stämme im Virulenzverhalten der Modelle auch im klinischen Bild wieder, womit hierbei eine gute Übereinstimmung zwischen Laboruntersuchung und Klinik erkennbar wurde. Weitere Untersuchungen mit höheren Fallzahlen könnten die Einteilung mglw. verschärfen.

Entscheidend für diese Studie waren die als eindeutig „niedrig virulent“ und „hoch virulent“ eingestuft Erreger und deren klinischer Verlauf. Hier konnte eine Korrelation des klinischen Verlaufes mit den Ergebnissen der Laboruntersuchungen eindeutig nachgewiesen werden. EDCC 5464 zeigte sich im Modell bspw. als „niedrig virulent“ und löste klinisch eine chronische Infektion aus. Auch der CRP-Wert lag bei 13,9 mg/ml bei stationärer Aufnahme, was eher typischerweise bei chronischen Infektionen der Fall ist. EDCC 5458 hingegen wurde als „hoch virulenter“ Stamm eingestuft und löste eine akute implantat-assoziierte Infektion aus. Bei stationärer Aufnahme zeigte hier der CRP-Wert 479 mg/ml. Resultierend zeigte diese Studie, dass durch Laboruntersuchung eindeutig unterscheidbare *S. aureus* Stämme auch im klinischen Alltag unterschiedliche Infektionen auslösen. „Niedrig virulent“ eingetufte Erreger chronische Infektionen, „hoch virulent“ eingestufte Erreger akute Infektionen. Untersuchungen mit höheren Fallzahlen könnten dieses Untersuchungsergebnis unterstützen.

#### 4.5 Korrelation der Ergebnisse, Limitationen und Ausblick

Die Untersuchung der Virulenz der infektiösen Erreger, allen voran *Staphylococcus aureus* spielt in der Diagnostik durch die Klassifizierung der akuten und der chronischen Infektion eine Rolle. Akute Infektionen werden zumeist den hoch virulenten Erregern wie *S. aureus* zugeschrieben. Verzögerte Infektionen hingegen sind meist mit den als niedrig virulent eingestuften Erregern wie *S. epidermidis* assoziiert. Die hämatogen gestreuten Infektionen, welche auch noch nach mehr als zwei Jahren auftreten können, hingegen können sich wiederum ebenfalls durch eine hohe Virulenz auszeichnen und sind somit oftmals mit *S. aureus*, Streptokokken aber auch *Enterobacteriaceae* in Verbindung zu bringen. Diese Unterteilung hat Implikationen auf die Therapieentscheidung. Zeigt sich ein Implantat und der Patient

trotz Infektion relativ stabil kann ein ausgiebiges Debridement bzw. ein einzeitiger Wechsel mit anschließender Antibiotikatherapie ausreichend sein. Die Bestimmung der Virulenz der Keime kann diese klinische Einteilung der akuten und chronischen Infektionen stützen bzw. noch weiter vertiefen. In dieser Arbeit wurden schon bei der geringen Fallzahl von acht Keimen aus Implantat-assoziierten Infektionen erhebliche Unterschiede im Virulenzverhalten innerhalb der Spezies *Staphylococcus aureus* festgestellt. Das Konzept, drei unterschiedliche Untersuchungsmodelle, *in-vivo*, *in-vitro* und die Biofilmbildung zu kombinieren, um die Virulenz der Erreger zu bestimmen und eine Korrelation zwischen der ausgelösten Infektion und den Ergebnissen der Untersuchungen festzustellen, wurde in dieser Form erstmals verwendet. Die Studie konnte eine Korrelation zwischen den Keimen EDCC 5464 (niedrig virulent) und EDCC 5458 (hoch virulent) in der Methodik mit dem klinischen Verlauf chronisch (EDCC 5464), sowie akut (EDCC 5458) erfolgreich nachweisen. Dieses Ergebnis kann durch die gering verwendete Anzahl an Keimen zwar nicht als allgemeingültig gelten, wirft aber dennoch die wichtige Frage auf, ob diese Unterschiede auch in Untersuchungen mit höheren Fallzahlen als evtl. Trend zu sehen wäre. Die Möglichkeit einer zusätzlichen Detektionsmethode für Implantat-assoziierte Infektionen könnte sich durch die weitere und exaktere Kategorisierung der Virulenz ergeben. Dabei sollte die Wahl der Untersuchungen auf Präzision und Schnelligkeit zielen, um frühzeitige Erkenntnisse der jeweiligen Implantatinfektion zu gewinnen. In dieser Studie zeigten die Keime auch innerhalb der drei Modelle eine Varianz im Virulenzverhalten. Das Gallerienmodell kann simpel und kostengünstig die Virulenz von Keimen in kurzer Zeit darstellen. Weitere Studien zum Vergleich von periprotetischen Infektionen und Virulenzverhalten im Gallerienmodell können eine Variante sein, um hoch virulente Erreger von niedrig virulenten Erregern deutlicher zu trennen. Dabei muss beachtet werden, dass Rückschlüsse nur aus einem Insektenmodell keine komplexe humane Immunreaktion beinhalten. Die Osteoblasteninfektion und Invasion durch *S. aureus* bei Implantatinfektionen konnte bisher vor allem *in-vitro* nachgewiesen werden (MOHAMED ET AL. 2014). Folgende Untersuchungen sollten dahingehend einen eindeutigen *in-vivo* Nachweis erbringen. Für eine rasche Diagnostik wäre dieses Assay momentan jedoch noch zu aufwändig und zeitintensiv. Die Biofilmbildung als Teil der *S. aureus* Überlebensstrategie hat eine enorme Bedeutung. Das Behandeln einer Implantat-assoziierten Infektion bei ausgereiftem Biofilm stellt eine große Herausforderung dar und ist häufig assoziiert mit langwierigen Erkrankungsverläufen in unterschiedlichen Ausprägungen (WAGNER C, HÄNSCH GM 2015). In dieser Studie zeigten sich zwei der vier stark Biofilm-bildenden *S. aureus* Stämme klinisch als akute Infektionen. Studien



mit höheren Fallzahlen könnten den hier möglicherweise gezeigten Trend belegen. Die frühzeitige Detektion der Biofilmbildung eines Keimes kann die Therapieoptionen beeinflussen.

## 5 Zusammenfassung

Implantat-assoziierte oder periprotetische Infektionen zählen zu den schwierigsten Krankheitsbildern in der Unfallchirurgie und Orthopädie. Die Infektion eines Implantates oder einer Prothese mit Bakterien führt zu langwierigen komplikationsreichen Krankheitsverläufen und ist mit erheblichen finanziellen Belastungen für die Gesundheitssysteme verbunden.

Die frühzeitige und individuell angepasste Diagnostik zur Verbesserung der Behandlung ist Gegenstand der Forschung. In dieser Arbeit wurde das Virulenzverhalten von acht *S. aureus* Isolaten aus Patienten mit Implantat-assoziierten Infektionen anhand des *in-vivo* *Galleria mellonella*-Infektionsmodells, der *in-vitro* Osteoblasteninfektion, sowie der Biofilmbildung miteinander verglichen und kategorisiert. Weiterhin wurde untersucht, ob hoch virulente Erreger mit einer akuten Infektion und niedrig virulente Erreger mit einer chronischen Infektion assoziiert sind.

Hierzu wurden die *Galleria mellonella* mit acht verschiedenen *Staphylococcus aureus* Stämmen mit einer Infektionsdosis von  $10^6$  infiziert. Die Virulenz der Bakterien wurde durch die prozentuale Überlebensrate der Gallerien gemessen. Aufgrund der Ergebnisse wurde ein Stamm als niedrig-virulent, drei Stämme als intermediär-virulent und vier Stämme als hoch-virulent eingestuft. Im Folgenden wurde die Invasionsfähigkeit und das Proliferationsverhalten der acht *S. aureus* Stämme an der SAOS-2 osteoblast-like Zelllinie untersucht. Die Stämme, EDCC 5458 und EDCC 5460 wurden als „hoch virulent“, EDCC 5457, EDCC 5461, EDCC 5456 als „intermediär virulent“ und EDCC 5455, EDCC 5459, EDCC 5464 als „niedrig virulent“ eingestuft. Mittels Kristallviolett-Färbung wurde die Fähigkeit zur Biofilmbildung der Stämme untersucht. EDCC 5455, EDCC 5459, EDCC 5460 und EDCC 5464 wurden als „schwach adhärent“ eingestuft. EDCC 5457, EDCC 5456, EDCC 5458 und EDCC 5461 als „stark adhärent“. Zusätzlich ergaben real-time PCR Untersuchungen, dass alle getesteten Stämme das Virulenzfaktor-Gen  $\alpha$ -Hämolysin exprimieren, im Gegensatz dazu aber keiner der Stämme das Pantone-Valentine Leukozidin-Gen exprimiert. Die Untersuchung der Aktivität und Funktionalität wurde nicht vorgenommen.

Die letztendliche Kategorisierung der *S. aureus* Stämme ergab einen „niedrig virulenten“ Erreger EDCC 5464, sechs „intermediär virulente“ Erreger (EDCC 5455, EDCC 5457, EDCC 60, EDCC 5461, EDCC 5456) und einen „hoch virulente“ Erreger EDCC 5458. Der als einziger MRSA-Keim intermediär virulente Erreger EDCC 5456 muss hierbei gesondert betrachtet werden. Durch die unterschiedliche Ausstattung an

Virulenzgenen, sowie die Resistenz gegenüber einer großen Bandbreite von Antibiotika ist ein Vergleich mit den MSSA-Keimen schwer möglich. Folgestudien mit weiteren MRSA-Keimen könnten hier einen vergleichenden Aufschluß der Keimvirulenz liefern.

Letztendlich korrelierte der als „niedrig virulent“ eingestufte MSSA-Erreger mit einer chronischen Infektion, und der als „hoch virulent“ eingestufte MSSA-Erreger mit einer akuten Infektion.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit ein unterschiedliches Virulenzverhalten von *Staphylococcus aureus* Stämmen, aus Implantat-assoziierten Infektionen. Die weitere Auswertung ergab, dass das Virulenzverhalten der Keime mit dem klinischen Erscheinungsbild korrelierte. Somit konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass ein als „hoch virulent“ eingestufte Keim für ein akutes Bild der Implantat-Infektion verantwortlich ist, wohingegen ein „niedrig virulenter“ Erreger verursachend für eine chronische Infektion. Diese Ergebnisse sind aufgrund der niedrigen Fallzahl statistisch nicht signifikant, zeigen jedoch einen eventuell vorliegenden Trend. Weitere Untersuchungen zur Aufschlüsselung und Kategorisierung des Virulenzverhalten von *Staphylococcus aureus* Keimen im Vergleich zum klinischen Bild der Infektion sind wünschenswert. Aufgrund dessen ist das Fazit dieser Studie, dass die Untersuchung der Keimvirulenz bei Implantat-assoziierten Infektion als zusätzliches Tool in der Diagnostik anvisiert werden sollte, um Therapiekonzepte frühzeitig individuell zu beeinflussen.

## 6 Abstract / Summery

Implant-associated infections (IABI), caused by *Staphylococcus aureus*, are one of the most difficult clinical pictures in orthopaedics and trauma surgery. In many cases IABI results in prolonged and complex progression of disease. The financial burden for health care systems is huge. The focus of the present investigation was to study virulence properties of eight different *S. aureus* clinical isolates from acute and chronic IABI by means of their *in vivo* lethality, *in vitro* osteoblast invasion and biofilm formation. The used insect infection model with *Galleria mellonella* revealed high, intermediate and low virulence phenotypes of these clinical isolates, which showed good correlation with osteoblast invasion and biofilm formation assays. The strains were categorised in "low virulent", "intermediate virulent" and "high virulent". The investigation revealed six "intermediate virulent" strains (EDCC 5455, EDCC 5457, EDCC 60, EDCC 5461, EDCC 5456), one "high virulent" strain EDCC 5458 and one "low virulent" strain EDCC 5464. The intermediate categorized MRSA strain EDCC 5456 should be considered separately, as the constitution of virulence genes is different from the MSSA strains. Further investigations of MRSA strains are recommended. Additional PCR real-time experiments revealed that  $\alpha$ -hemolysin was expressed by all tested isolates but in none of them the expression of Pantone-Valentine leucocidin was found. No testing of their activity or functionality was carried out.

In conclusion, the *in vitro* and *in vivo* investigations of eight different *S. aureus* strains from IABI demonstrated a diverse virulence. In addition, the results of the *in vitro* and *in vivo* experiments showed a good correlation with the clinical symptoms of the patients. The "low virulent" *S. aureus* EDCC 5464 lead to a chronic infection, the "high virulent" *S. aureus* EDCC 5458 lead to an acute infection in patients.

These pilot-investigation can be considered as a starting point for a new way of clinical diagnostic in order to improve understanding of pathogenesis and treatment of IABI.

**Literaturverzeichnis**

- AGERER F, LUX S, MICHEL A, ROHDE M, OHLSEN K, HAUCK C R (2005): Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* reveals a functional link between focal adhesion kinase and cortactin in integrin-mediated internalization. *J Cell Sci.* 2005 May 15; 118(Pt 10)
- AHMAD SS, SHAKER A, SAFFARINI M, CHEN AF, HIRSCHMANN MT, KOHL S (2016): Accuracy of diagnostic tests for prosthetic joint infection: a systematic review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2016 Oct;24(10):3064-3074.
- AHMED S, MEGHJI S, WILLIAMS RJ, HENDERSON B, BROCK JH, NAIR SP (2001): *Staphylococcus aureus* binding proteins are essential for internalization by osteoblasts but not account for differences in intracellular levels of bacteria. *Infect Immun.* 2001 May;69(5):2872-7
- ALEXANDER EH, BENTO JL, HUGHES FM JR, MARRIOTT I, HUDSON MC, BOST KL (2001): *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Serovar Dublin Induce Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Expression by Normal Mouse and Human Osteoblasts. *Infect Immun.* 2001 Mar;69(3):1581-6
- ALMEIDA RA, MATTHEWS KR, CIFRIAN E, GUIDRY AJ, OLIVER SP (1996): *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci.* 1996 Jun;79(6):1021-6.
- AL MOHAJER M, DAROUICHE RO (2014): The expanding horizon of prosthetic joint infections. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2014 Jun 12;12(1):1-12.
- ALT V, LIPS KS, HENKENBEHRENS C, MUHRER D, OLIVEIRA CAVALCANTI MC, SOMMER U, THORMANN U, SZALAY G, HEISS C, PAVLIDIS T, DOMANN E, SCHNETTLER R (2012): A new animal model for implant-related infected non-unions after intramedullary fixation of the tibia in rats with fluorescent in situ hybridization of bacteria in bone infection. *Bone.* 2011 May 1;48(5):1146-53.
- ALT V, KIRCHHOF K, SEIM F, HRUBESCH I, LIPS KS, MANNEL H, DOMANN E, SCHNETTLER R (2014): Rifampicin-fosfomycin coating for cementless endoprostheses: antimicrobial effects against methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Acta Biomater.* 2014 Oct;10(10):4518-24.
- ARCHER N K, MAZAITIS M J, COSTERTON J W, LEID J G, POWERS M E, SHIRTLIFF M E (2001): *Staphylococcus aureus* biofilms: Properties, regulation and roles in human disease. *Virulence.* 2011 Sep-Oct;2(5):445-59.
- ARCIOLA C R, CAMPOCCIA D, EHRLICH G D, MONTANARO L (2015): Biofilm-Based Implant Infections in Orthopaedics. *Adv Exp Med Biol.* 2015;830:29-46.
- ARICOLA C R, VISAI L, TESTONI F, ARCIOLA S, CAMPOCCIA D, SPEZIALE P, MONTANARO L (2011): Concise survey of *Staphylococcus aureus* virulence factors that promote adhesion and damage to peri-implant tissues. *Int J Artif Organs.* 2011 Sep;34(9):771-80.

- BANKE IJ, STADE N, PRODINGER PM, MÜHLHOFER HM, THOMAS P, THOMAS B, SUMMER B, VAN GRIENSVEN M, VON EISENHART-ROTHE R, GOLLWITZER H (2015): Synovial biomarkers for differential diagnosis of painful arthroplasty. *Orthopade*. 2015 Dec;44(12):93, 936-8, 940-1.
- BARRETT L, ATKINS B (2014): The clinical presentation of prosthetic joint infection. *J Antimicrob Chemother* 2014 Sep;69 Suppl 1:i25-7.
- BAYLES KW, WESSON CA, LIU LE, FOX LK, BOHACH GA, TRUMBLE WR (1998): Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. *Infect Immun*. 1998 Jan;66(1):336-42.
- BEEKHUIZEN H, VAN DE GEVEL JS, OLSSON B, VAN BENTEN IJ, VAN FURTH R (1997): Infection of human vascular endothelial cells with *Staphylococcus aureus* induces hyperadhesiveness for human monocytes and granulocytes. *J Immunol*. 1997 Jan 15;158(2):774-82.
- BERBARI E, MABRY T, TSARAS G, SPANGHEL M, ERWIN PJ, MURAD MH, STECKELBERG J, OSMON D (2010): Inflammatory blood laboratory levels as markers of prosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am*. 2010 Sep 1;92(11):2102-9.
- BORENS O, HELMY N (2016): Infizierte Osteosynthese. *Chirurg* (2016) 87:822.
- BOYLE-VAVRA S, DAUM R S (2007): Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantone-Valentine leukocidin. *Lab Invest*. 2007 Jan; 87 (1).
- BRENNAN M, THOMAS DY, WHITEWAY M, KAVANAGH K (2002): Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002 Oct 11;34(2):153-7.
- CAMPOCCIA D, SPEZIALE P, RAVIOLI S, CANGINI I, RINDI S, PIRINI V, MANTANARO L, ARCIOLA C R (2009): The presence of both bone sialoprotein-binding protein gene and collagen adhesion gene as a typical virulence trait of the major epidemic cluster in isolates from orthopaedic implant infections. *Biomaterials*. 2009 Dec;30(34):6621-8.
- CAMPOCCIA D, MONTANARO L, ARCIOLA CR (2006): The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials*. 2006 Apr;27(11):2331-9. Epub 2005 Dec 20.
- CLARO T, WIDAA A, O'SEAGHDHA M, MIAJLOVIC H, FOSTER TJ, O'BRIEN FJ, KERRIGAN SW (2011): *Staphylococcus aureus* protein A binds to osteoblasts and triggers signals that weaken bone in osteomyelitis. *PLoS One*. 2011 Apr 15;6(4):e18748
- CHRISTENSEN GD, SIMPSON WA, YOUNGER JJ, BADDOUR LM, BARRETT FF, MELTON DM, BEACHEY EH (1985): Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*. 1985 Dec; 22(6):996-1006.
- COBO J, DEL POZO JL (2011): Prosthetic joint infection: diagnosis and management. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011 Sep;9(9):787-802.

- COSTA CR, JOHNSON AJ, NAZIRI Q, MARALUNDA GA, DELANOIS RE, MONT MA (2012): Efficacy of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein level in determining periprosthetic hip infections. *Am J Orthop* (Belle Mead NJ). 2012 Apr;41(4):160-5.
- COTTER G, DOYLE S, KAVANAGH K (2002): Development of an insect model for in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000 Feb;27(2):163-9.
- CUE D, LEI M G, LEE C Y (2012): Genetic regulation of the intracellular adhesion locus of staphylococci. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012 Mar 26;2:38.
- CUNNINGHAM R, COCKAYNE A, HUMPHREYS H (1996): Clinical and molecular aspects of the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* and joint infections. *J Med Microbiol*. 1996 Mar; 44(3):157-64.
- CORRIGAN RM, MIAJLOVIC H, FORSTER TJ (2009): Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells. *BMC Microbiol*. 2009 Jan 30;9:22.
- CRAM P, LU X, KATES SL, SINGH JA, LI Y, WOLF BR (2012): total knee arthroplasty volume, utilization, and outcomes among Medicare beneficiaries, 1991 – 2010. *JAMA*. 2012 Sep 26;308(12):1227-36.
- CRAVEN RR, GAO X, ALLEN IC, GRIS D, BUBECK WARDENBURG J, McELVANIA-TEKIPPE E, TING JP, DUNCAN JA (2009): *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells. *PLoS One*. 2009 Oct 14;4(10):e7446
- DAROUCHE R O (2004): Treatment of Infections Associated with Surgical Implants. *N Engl J Med*. 2004 Apr 1;350(14):1422-9
- DELLA VALLE C, PARVIZI J, BAUER TW, DICESARE P E, EVANS R P, SEGRETI J, SPANGHEIL M, WATTERS W C 3<sup>RD</sup>, KEITH M, TURKELSON C M, WIES J L, SLUKA P, HITCHCOCK K; AMERICAN ACADEMY OF ORTHOPAEDIC SURGEONS (2011): American Academy of Orthopaedic Surgeons Clinica Practice Guidelineon: The Diagnosis od Periprosthetic Joint Infections of the hip and Knee. *J Bone Joint Surg Am*. 2011 Jul 20;93(14):1355-7.
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ENDOPROTHETIK (2010): Periprothetische Infektionen am Hüftgelenk – von der Forschung in die Klinik. Im Internet unter: [http://www.ag-endoprothetik.org/index.php?option=com\\_phocadownload&view=category&download=1:ae-bulletin-2010&id=2:ae-bulletins&Itemid=164](http://www.ag-endoprothetik.org/index.php?option=com_phocadownload&view=category&download=1:ae-bulletin-2010&id=2:ae-bulletins&Itemid=164), Stand: 29.12.2016 (Abrufdatum).
- DESALERMOS A, FUCHS BB, MYLONAKIS E (2012): Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. *PLoS Pathog*. 2012 Feb;8(2):e1002451.
- DOLL K, JONGSTHAPHONGPUN KL, STUMPP NS, WINKEL A, STIESCH M (2016): Quantifying implant-associated biofilms: Comparison of microscopic, microbiologic and biochemical methods. *J Microbiol Methods*. 2016 Nov;130:61-68.

- DJORDJEVIC D, WIEDMANN M, MCCLANDSBOROUGH LA (2002): Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Jun;68(6):2950-8.
- EDWARDS AM, POTTER U, MEENAN NA, POTTS JR, MASSEY RC (2011): Staphylococcus aureus Keratinocyte Invasion Is Dependent upon Multiple High-Affinity Fibronectin- Binding Repeats within FnBPA. *PLoS One.* 2011 Apr 22;6(4):e18899.
- ELLINGTON JK, REILLY SS, RAMP WK, SMELTZER MS, KELLAM JF, HUDSON MC (1999): Mechanisms of Staphylococcus aureus invasion of cultured osteoblasts. *Microb Pathog.* 1999 Jun;26(6):317-23
- ELLINGTON JK, ELHOFY A, BOST KL, HUDSON MC (2001): Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in Staphylococcus aureus invasion of normal osteoblasts. *Infect Immun.* 2001 Sep;69(9):5235-42.
- ESSMANN F, BANTEL H, TOTZKE G, ENGELS IH, SINHA B, SCHULZE-OSTHOFF K, JÄNICKE RU (2003): Staphylococcus aureus alpha-toxin-induced cell death: predominant necrosis despite apoptotic caspase activation. *Cell Death Differ.* 2003 Nov;10(11):1260-72.
- EVANS BA, ROZEN DE (2012): A Streptococcus pneumoniae infection model in larvae of the wax moth *Galleria mellonella*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 Oct;31(10):2653-60.
- FEDHILA S, BUISSON C, DUSSURGET O, SERROR P, GLOMSKI IJ, LIEHL P, LERECLUS D, NIELSEN-LEROUX C (2010): Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol.* 2010 Jan;103(1):24-9.
- FOGH J, WRIGHT WC, LOVELESS JD (1977): Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1977 Feb;58(2):209-14.
- FOSTER T J, GEOGHEGAN J A, GANESH V K, HÖÖK M (2006): Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol.* 2014 Jan;12(1):49-62.
- FRAUNHOLZ M, SINHA B (2012): Intracellular Staphylococcus aureus: live-in and let die. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012 Apr 24;2:43.
- GARELLICK G, KÄRRHOLM J, LINDAHL H, MALCHAU H, ROGMARK C, ROLFSON O (2014): The swedish Hip Arthroplasty Register. Annual Report 2014. Im Internet unter: [http://www.shpr.se/Libraries/Documents/Annual\\_Report\\_2014\\_Eng.sflb.ashx](http://www.shpr.se/Libraries/Documents/Annual_Report_2014_Eng.sflb.ashx), Stand: 13.11.2016 (Abrufdatum).
- GEHRKE T, ALIJANIPOUR P, PARVIZI J (2015): The management of an infected total knee arthroplasty. *Bone Joint J.* 2015 Oct;97-B(10 Suppl A):20-9.
- GIAOURIS E, HEIR E, DESVAUX M, HEBRAUD M, MORETRO T, LANGSRUD S, DOULGERAKI A, NYCHAS GJ, KAČANIOVÁ M, CZACZYK K, ÖLMEZ H, SIMÕES M (2015): Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Front Microbiol.* 2015 Aug 20;6:841.



- GIBREEL TM, UPTON M (2013): Synthetic epidermicin NI01 can protect *Galleria mellonella* larvae from infection with *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Oct;68(10):2269-73.
- GHANEM E, PARVIZI J, BURNETT R S, SHAKERY P F, KESHAVARZI N, AGGARWAL A, BARRACK R L (2008): Cell count and differential of aspirated fluid in the diagnosis of infection at the site of total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am.* 2008 Aug;90(8):1637-43.
- GOODMAN SB, YAO Z, KEENEY M, YANG F (2013): The future of biologic coatings for orthopaedic implants. *Biomaterials.* 2013 Apr; 34(13):3174-83.
- GUSTILO R B, MERKOW R L, TEMPLEMAN D (1990): The management of open fractures. *J Bone Joint Surg Am.* 1990; 72:299-304
- GRISTINA AG, ROVERE GD (1963): An in vitro study on the effects of metals used in internatl fixation on bacterial growth and dissemination. *J Bone Joint surg.* 1963;45:1104-1104.
- HAHN H (1991): "Staphylokokken." *Medizinische Mikrobiologie.* Springer Berlin Heidelberg, 1991. 249-260.
- HAMMER N D, SKAAR E P (2011): Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* iron acquisition. *AnnuRev Microbiol.* 2011;65:129-47.
- HANSMANN C (1886): Eine neue Methode der Fixierung der Fragmente bei complizierten Frakturen. *Verh Dtsch Ges Chir* 15:134.
- HAUCK C R, OHLSEN K (2006): Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Feb;9(1):5-11.
- HARRIS L G, GEOFF R (2006): Staphylococci and implant surfaces: a review. *Injury, Int. J. Care Injured* 2006; 37 S3-S14.
- HEILMANN C (2011): Adhesion mechanisms of staphylococci. *Adv Exp Med Biol.* 2011;715:105-23.
- HELLER K D (2016): Diagnostik des periprothetischen Infekts – Was ist Pflicht, was ist optional? *Z Orthop Unfall.* 2016 Aug;154(4):398-405.
- HOBLEY LAURA, HARKINS C, MACPHEE C E, STANLEY-WALL N R (2015): Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev.* 2015 Sep;39(5):649-69.
- JANDER G, RAHME LG, AUSUBEL FM (2000): Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol.* 2000 Jul;182(13):3843-5.
- JOHANNESSEN M, SOLLID JE, HANSSEN AM (2012): Host- and microbe determinants that may influence the success of *S. aureus* colonization. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012 May 4;5:56.

- JOSSE J, VELARD F, GANGLOFF S C (2015): *Staphylococcus aureus* vs. Osteoblast: Relationship and Consequences in Osteomyelitis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015 Nov 26;5:85.
- KAPLAN J B (2010): Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *J Dent Res*. 2010 Mar; 89(3):205-18.
- KATSIKOIANNI M, MISSIRLIS YF (2004): Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater*. 2004 Dec 7;8:37-57
- KAVANAGH K, REEVES EP (2004): Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev*. 2004 Feb;28(1):101-12.
- KOCH R (1878): Untersuchung über die Ätiologie der Wundinfektionskrankheiten. Leipzig, 1878. In: Deutsches Textarchiv <[http://www.deutschestextarchiv.de/koch\\_wundinfektionskrankheiten\\_1878/13](http://www.deutschestextarchiv.de/koch_wundinfektionskrankheiten_1878/13)> , S. [3], abgerufen am 18.02.2017.
- KOSTAKIOTI M, HADJIFRANGISKOU M, HULTGREN SJ (2013): Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Apr 1;3(4):a010306.
- KURTZ S M, LAU E, SCHMIER J, ONG K L, ZHAO K, PARVIZI J (2008): Infection burden for hip and knee arthroplasty in the United States. *J Arthroplasty*. 2008 Oct;23(7):984-91.
- KURTZ S M, LAU E, WATSON H, SCHMIER J K, PARVIZI J (2012): Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. *J Arthroplasty*. 2012 Sep;27(8Suppl):61-5.e1.
- KLEBER C, SCHASER KD, TRAMPUZ A (2015): Complication management of infected osteosynthesis: Therapy algorithm for peri-implant infections. *Chirurg*. 2015 Oct;86(10):925-34.
- KLEIN E, SMITH D, LAXMINARAYAN R (2009): Community-associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Outpatients, United States, 1999-2006. *Emerge Infect Dis*. 2009 Dec; 15(12):1925-30.
- KRAFT CN, SCHLEGEL U, PFLUGER D, EIJER H, TEXTOR J, HANSIS M, ARENS S (2001): Radiological signs of osteitis around extramedullary metal implants. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2001 Jun;121(6):338-42.
- KREMERS HM, NWOJO ME, RANSOM JE, WOOD-WENTZ CM, MELTON LJ 3RD, HUDDLESTON PM 3<sup>rd</sup> (2015): Trends in the epidemiology of osteomyelitis: a population-based study, 1969-2009. *J Bone Joint Surg Am*. 2015 May 20;97(10):837-45.
- LACEY KA, GEOGHEGAN JA, MCLOUGHLIN RM (2016): The Role of *Staphylococcus aureus* Virulence Factors in Skin Infection and Their Potential as Vaccine Antigens. *Pathogens*. 2016 Feb 17;5(1).

- LAYER F, CUNY C, STROMMINGER B, WERNER G, WITTE W (2012): Aktuelle Daten und Trends zu Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (.). Bundesgesundheitsbl 2012; 55:1377-1386.
- LE K Y, OTTO M (2015): Quorum-sensing regulation in staphylococci - an overview. Front Microbiol. 2015 Oct 27;6:1174.
- LEE HD, PRASHANT K, SHON WY (2015): Management of Periprosthetic Hip Joint Infection. Hip Pelvis. 2015 Jun;27(2):63-71.
- LICITRA G (2013): Etymologia: *Staphylococcus*. Emerg Infect Dis. 2013 Sep; 19(9): 1553
- LIMA AL, OLIVEIRA PR, CARVALHO VC, SACONI ES, CABRITA HB, RODRIGUES MB (2013): Periprosthetic joint infections. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2013;2013:542796.
- LINDSAY S, OATES A, BOURDILLON K (2017): The detrimental impact of extracellular bacterial proteases on wound healing. Int Wound J. 2017 Jul 25.
- LISTER J L, HORSWILL A R (2014): *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. Front Cell Infect Microbiol. 2014 Dec 23;4:178.
- LOSINA E, THORNHILL T S, ROME B N, WRIGHT J, KATZ J N (2012): The dramatic increase in total knee replacement utilization rates in the United States cannot be fully explained by growth in population size and the obesity epidemic. J Bone Joint Surg Am 2012 Feb 1;94(3):201-7.
- LUHR, H-G (2000): "Entwicklung der modernen Osteosynthese." Mund-, Kiefer-und Gesichtschirurgie 4.1 (2000): S084-S090.
- MAFFULLI N, PAPALIA R, ZAMPOGNA B, TORRE G, ALBO E, DENARO V (2016): The management of osteomyelitis in the adult. Surgeon. 2016 Dec; 14(6): 345-360.
- MANNALA GK, KOETTNITZ J, MOHAMED W, SOMMER U, LIPS KS, SPRÖER C, BUNK B, OVERMANN J, HAIN T, HEISS C, DOMANN E, ALT V (2018): Whole-genome comparison of high and low virulent *Staphylococcus aureus* isolates inducing implant-associated bone infections. Int J Med Microbiol. 2018 Apr 25. pii: S1438-4221(17)30603-3.
- MARÍN M, GARCIA-LECHUZ JM, ALONSO P, VILLANUEVA M, ALCALÁ L, GIMENO M, CERCENADO E, SÁNCHEZ-SOMOLINOS M, RADICE C, BOUZA E (2012): Role of universal 16S rRNA gene PCR and sequencing in diagnosis of prosthetic joint infection. J Clin Microbiol. 2012 Mar;50(3):583-9
- MARRAFFINI LA, DEDENT AC, SCHNEEWIND O (2006): Sortases and the art of anchoring proteins to envelopes of gram-positiv bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 2006 Mar;70(1):192-221
- MCCARTHY H, RUDKIN JK, BLACK NS, GALLAGHER L, O'NEILL E, O'GARA JP (2015): Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. Front Cell Inface. Microbiol. 2015 Jan 28;5:1.

- MESTRE MB, FADER CM, SOLA C, COLOMBO MI (2010): Alpha-hemolysin is required for the activation of the autophagic pathway in *Staphylococcus aureus*-infected cells. *Autophagy*. 2010 Jan;6(1):110-25.
- METSEMAKERS W J, KUEHL R, MORIARTY T F, RICHARDS R G, VERHOFSTAD M H J, BORENS O, KATES S, MORGENSTERN M (2016): infection after fixation: Current surgical and microbiological concepts. *Injury* 2016 Sep 11. Pii: S0020-1383(16)30470-3.
- MOHAMED W, SOMMER U, SETHI S, DOMANN E, THORMANN U, SCHÜTZ I, LIPS KS, CHAKRABORTY T, SCHNETTLER R, ALT V (2014): Intracellular proliferation of *S. aureus* in osteoblasts and effects of rifampicin and gentamycin on *S. aureus* intracellular proliferation and survival. *Eur Cell Mater*. 2014 Oct 23;28:258-68.
- MONTANARO L, TESTONI F, POGGI A, VISAI L, SPEZIALE P, ARCIOLA CR (2011): Emerging pathogenetic mechanisms of the implant- related osteomyelitis by *Staphylococcus aureus*. *Int J Artif Organs*. 2011 Sep;34(9):781-8
- MUKHERJEE K, ALTINCIK B, HAIN T, DOMANN E, VILCINSKAS A, CHAKRABORTY T (2010): *Galleria mellonella* system as a model system for studying *Listeria* monocytogenesis. *Appl Environ Microbiol*. 2010 Jan;76(1):310-7.
- MÜHLHOFER H M L, SUREN C, FEIHL S (2016): Oberstes Ziel: Die Endoprothese retten. *MMW – Fortschritte der Medizin* (2016) 158: 45.
- MÜLLER ME, ALLGÖWER M, WILLENEGGER H (1963): Technik der operativen Frakturbehandlung. Springer, Berlin Göttingen Heidelberg
- PETRELLI D, REPETTO A, D'ERCOLE S, ROMBINI S, RIPA S, PRENNA M, VITALI LA (2008): Analysis of meticillin-susceptible and meticillin-resistant biofilm-forming *Staphylococcus aureus* from catheter infections isolated in a large Italian hospital. *J Med Microbiol*. 2008 Mar;57(Pt 3):364-72. doi: 10.1099/jmm.0.47621-0
- NAMBA RS, INACIO MC, PAXTON EW (2012): Risk factors associated with surgical site infection in 30,491 primary total hip replacements. *J Bone Joint Surg Br*. 2012 Oct;94(10):1330-8.
- O'GARA J P (2007): *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2007 May; 270(2):179-88.
- PATTY JM, ALLEN BL, MCGAVIN MJ, HÖÖK M (1994): MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol*. 1994;48:585-617.
- PERLROTH J, KUO M, TAN J, BAYER AS, MILLER LG (2008): Adjunctive use of rifampin for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review of the literature. *Arch Intern Med*. 2008 Apr 28;168(8):805-19.
- PETRETTA R, PHILLIPS J, TOMS A (2016): Management of acute periprosthetic joint infection of the knee – Algorithmus for the on call surgeon. *Surgeon* 2016 Jun 23. pii: S1479 – 666X(16)30023-3.
- PÉREZ-MONTARELO D, VIEDMA E, MURCIA M, MUÑOZ-GALLEGO I, LARROSA N, BRAÑAS P, FERNÁNDEZ-HIDALGO N, GAVALDÀ J, ALMIRANTE B, CHAVES F (2017): Pathogenic

- Characteristics of *Staphylococcus aureus* Endovascular Infection Isolates from Different Clonal Complexes. *Front Microbiol.* 2017 May 19;8:917
- PURVES J, COCKAYNE A, MOODY PC, MORRISSEY JA (2010): Comparison of the Regulation, Metabolic Functions, and Roles in Virulence of the Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Homologues gapA and gapB in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 2010 Dec;78(12):5223-32.
- PRIBAZ JR, BERNTHAL NM, BILLI F, CHO JS, RAMOS RI, GUO Y, CHEUNG AL, FRANCIS KP, MILLER LS (2012): Mouse model of chronic post-arthroplasty infection: noninvasive in vivo bioluminescence imaging to monitor bacterial burden for long-term study. *J Orthop Res.* 2012 Mar;30(3):335-40.
- RAMARAO N, NIELSEN-LEROUX C, LERECLUS D (2012): The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. *J Vis Exp.* 2012 Dec 11;(70): e4392.
- REILLY SS, HUDSON MC, KELLAM JF, RAMP WK (2000): In Vivo Internalization of *Staphylococcus aureus* by Embryonic Chick Osteoblasts. *Bone.* 2000 Jan;26(1):63-70.
- RENZ N, FEIHL S, DLASKA CE, SCHÜTZ MA, TRAMPUZ A (2017): Osteosynthesis-associated infections: Epidemiology, definition and diagnosis. *Unfallchirurg.* 2017 Jun;120(6):454-460.
- RENZ N, MÜLLER M, PERKA C, TRAMPUZ A (2016): Implantat-assoziierte Infektion – Diagnostik. *Chirurg* 2016 87:813-821.
- RENZ N, HUBACHER T, KLEBER C, TRAMPUZ A (2016): Infektionen nach osteosynthetischer Frakturversorgung. *SWISS MEDICAL FORUM* 2016;16(4):85-91. Im Internet unter: <https://medicalforum.ch/de/issue/edn/smf.2016.04/> Stand: 14.05.2018 (Abrufdatum)
- RIBEIRO M, MONTEIRO FJ, FERRAZ MP (2012): Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. *Biomater.* 2012 Oct-Dec;2(4):176-94.
- RODAN SB, IMAI Y, THIEDE MA, WESOLOWSKI G, THOMPSON D, BAR-SHAVIT Z, SHULL S, MANN K, RODAN GA (1987): Characterization of a Human Osteosarcoma Cell Line (Saos-2) with Osteoblastic Properties. *Cancer Res.* 1987 Sep 15;47(18):4961-6.
- RODRÍGUEZ D, PIGRAU C, EUBA G, COBO J, GARCÍA-LECHUZ J, PALOMINO J, RIERA M, DEL TORO MD, GRANADOS A, ARIZA X; REIPI GROUP (SPANISH NETWORK FOR RESEARCH IN INFECTIOUS DISEASE) (2010): Acute haematogenous prosthetic joint infection: prospective evaluation of medical and surgical management. *CLIN MICROBIOL INFECT.* 2010 DEC;16(12):1789-95.
- ROHDE H, BURANDT EC, SIEMSSSEN N, FROMMELT L, BURDELSKI C, WURSTER S, SCHERPE S, DAVIES AP, HARRIS LG, HORSTKOTTE MA, KNOBLOCH JK, RAGUNATH C, KAPLAN JB, MACK D (2007): Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials.* 2007 Mar;28(9):1711-20.

- PURELLO SM, DAUM RS, EDWARDS GF, LINA G, LINDSAY J, PETERS G, STEFANI S (2014): Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) update: New insights into bacterial adaption and therapeutic targets. *J Glob Antimicrob Resist*. 2014Jun;2(2):61-69.
- SAADATIAN-ELAHI M, TEYSSOU R, VANHEMS P (2007): *Staphylococcus aureus*, the major pathogen in orthopaedic and cardiac surgical site infections: A literature review. *Int J Surg*. 2008 Jun; 6(3).
- SCHADE J, WEIDENMAIER C (2016): Cell wall glycopolymers of Firmicutes and their role as nonprotein adhesins. *FEBS Lett*. 2016 Nov; 590(21):3758-3771.
- SCHINSKY M F, DELLA VALLE CJ, SPORER S M, PAPROSKY W G (2008): Perioperative testing for joint infection in patients undergoing revision total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Sep;90(9):1869-75.
- SCHMITT W (1982): Robert Koch; man and work (author's transl). *Zentralbl Chir*. 1982;107(5-6):251-9.
- SCHRÖDER A, KLAND R, PESCHEL A, VON EIFF C, AEPFELBACHER M (2006): Live cell imaging of phagosomal maturation in *Staphylococcus aureus* infected human endothelial cells: small colony variants are able to survive in lysosomes. *Med Microbiol Immunol*. 2006 Dec;195(4):185-94. Epub 2006 Apr 5.
- SHABRAM P, AGUILAR-CORDOVA E (2000): Multiplicity of Infection/Multiplicity of Confusion. *Mol Ther*. 2000 Nov;2(5):420-1.
- SMELTZER MS, GILLASPY AF (2000): Molecular pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis. *Poult Sci* 2000 Jul;79(7):1042-9.
- TANDE AJ, PATEL R (2014): Prosthetic joint infection. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Apr;27(2):302-45.
- TETREULT MW, WETTERS NG, AGGARWAL VK, MORIC M, SEGreti J, HUDDLESTON JI 3RD, PARVIZI J, DELLA VALLE CJ (2013): Should draining wounds and sinuses associated with hip and knee arthroplasties be cultured? *J Arthroplasty*. 2013 Sep;28(8 Suppl):133-6.
- THAKORE R V, GREENBERG S E, SHI H, FOX A M, FRENCOIS E L, PRABLEK M A, NWOSU S K, ARCHER K R, EHRENFELD J M, OBREMSKEY W T, SETHI M K (2015): Surgical site infection in orthopaedic trauma: A case-control study evaluating risk factors and cost. *J Clin Orthop Trauma* 2015 Dec;6(4):220-6.
- TOTÉ K, VANDEN BERGHE D, MAES L, COS P (2008): A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lett Appl Microbiol*. 2008 Feb;46(2):249-54. Epub 2007 Dec 7.
- TRAMPUZ A, HANSEN AD, OSMON D R, MANDREKAR J, STECKELBERG J M, PATEL R (2004): Synovial fluid leukocyte count and differential for the diagnosis of prosthetic knee infection. *Am J Med*. 2004 Oct 15;117(8):556-62.
- TRAMPUZ A, ZIMMERLI W (2006): Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. *Injury*. 2006 May; 37 Suppl 2:S59-66.

- TRAMPUZ A, PIPER KE, JACOBSON MJ, HANSEN AD, UNNI KK, OSMON DR, MANDREKAR JN, COCKERILL FR, STECKELBERG JM, GREENLEAF JF, PATEL R (2007): Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med*. 2007 Aug 16;357(7):654-63.
- TUCKER KA, REILLY SS, LESLIE CS, HUDSON MC (2000): Intracellular *Staphylococcus aureus* induces apoptosis in mouse osteoblasts. *FEMS Microbiol Lett*. 2000 May 15;186(2):151-6.
- TZENG A, TZENG TH, VASDEV S, KORTH K, HEALEY T, PARVIZI J, SALEH KJ (2015): Treating periprosthetic joint infections as biofilms: key diagnosis and management strategies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015 Mar; 81(3):193-200.
- VARRONE JJ, DE MESY BENTLEY KL, BELLO-IRIZARRY SN, NISHITANI K, MACK S, HUNTER JG, KATES SL, DAISS JL, SCHWARZ EM (2014): Passive immunization with anti-glucosaminidase monoclonal antibodies protects mice from implant-associated osteomyelitis by mediating opsonophagocytosis of *Staphylococcus aureus* megacusters. *J Orthop Res*. 2014 Oct;32(10):1389-96.
- WAGNER C, HÄNSCH GM (2015): Pathophysiology of implant-associated infections: From biofilm to osteolysis and septic loosening. *Orthopade*. 2015 Dec;44(12):967-73.
- WAGNER C, AYTAC S, HÄNSCH GM (2011): Biofilm growth on implants: bacteria prefer plasma coats. *Int J Artif Organs*. 2011 Sep;34(9):811-7.
- WERBICK C, BECKER K, MELLMANN A, JUUTI KM, VON EIFF C, PETERS G, KUUSELA PI, FRIEDRICH AW, SINHA B (2007): Staphylococcal chromosomal cassette *mec* type I, *spa* type, and expression of PIs are determinants of reduced cellular invasiveness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J Infect Dis*. 2007 Jun 1;195(11):1678-85.
- WEIDENMAIER C, KOKAI-KUN JF, KULAUZOVIC E, KOHLER T, THUMM G, STOLL H, GÖTZ F, PESCHEL A (2008): Differential roles of sortase-anchored surface proteins and wall teichoic acid in staphylococcal *aureus* nasal colonization. *Int J Med Microbiol*. 2008 Jul; 298(5-6):505-13.
- WENGLER A, NIMPTSCH U, MANSKY T: Hip and knee replacement in Germany and the USA – analysis of individual in patient data from German and US hospitals for the years 2005 to 2011. *Dtsch Arztebl Int* 2014; 111: 407 – 16.
- ZHANG H, ZHENG Y, GAO H, XU P, WANG M, LI A, MIAO M, XIE X, DENG Y, ZHOU H, DU H (2016): Identification and Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains with an Incomplete Hemolytic Phenotype. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016 Nov 18;6:146.
- ZIMMERLI W (2014): Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection. *J Intern Med* 2014; 276: 111-119.
- ZIMMERLI W, MOSER C (2014): Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012 Jul; 65(2):158-68.
- ZIMMERLI W, SENDI P (2011): Orthopedic Implant-Associated Infections. *Semin Immunopathol* (2011) 33:295.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anteil der MRSA an allen untersuchten <i>S. aureus</i> ; Daten aus den Resistenzstudien der Paul-Ehrlich-Gesellschaft; .....	6
Abbildung 2: Funktion der cell-wall-anchored (CWA)-Proteine von <i>S. aureus</i> ; ..	8
Abbildung 3 Staphylococcus aureus Biofilmbildung; .....	12
Abbildung 4: PIA-abhängige und PIA-unabhängige Biofilmbildung <i>S. aureus</i> ; ..	13
Abbildung 5: Die Diagnose der periprothetischen Infektion; .....	19
Abbildung 6: Chirurgischer Behandlungsalgorithmus für periprothetische Infektionen; .....	23
Abbildung 7 Behandlungsalgorhytmus der periimplantären Infektion; .....	24
Abbildung 8 <i>Galleria mellonella</i> Larven; .....	32
Abbildung 9: Wachstumskurven für <i>S. aureus</i> EDCC 5455, 5456, 5457 und 5458; .....	36
Abbildung 10: Wachstumskurven für <i>S. aureus</i> EDCC 5459, 5460, 5461 und 5464; .....	37
Abbildung 11: Überlebensrate der Gallerien nach Infektion mit <i>S. aureus</i> ; .....	38
Abbildung 12: Osteoblasteninfektion mit <i>S. aureus</i> EDCC 5455 und EDCC 5459; .....	40
Abbildung 13: Osteoblasteninfektion EDCC 5457 und EDCC 5461; .....	41
Abbildung 14: Osteoblasteninfektion EDCC 5456 und EDCC 5464; .....	41
Abbildung 15: Osteoblasteninfektion EDCC 5460 und EDCC 5458; .....	42
Abbildung 16: Viabilität der SAOS2-Zellen infiziert mit <i>S. aureus</i> ; .....	44
Abbildung 17: Biofilmbildung aller 8 untersuchten <i>S. aureus</i> Stämme; .....	45
Abbildung 18: Graphische Darstellung der PVL-PCR Ergebnisse; .....	47
Abbildung 19: Graphische Darstellung des $\alpha$ -Hämolysin-PCR Ergebnis; .....	49



**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 Frequenz von MRSA in Krankenhäusern der USA;.....	7
Tabelle 2: Kurzübersicht Epidemiologie der Implantat-assoziierten Infektionen; .....	16
Tabelle 3: Vergleich der Klassifikationen: Unfallchirurgische Osteosynthese / periprothetische Infektionen .....	18
Tabelle 4: Einteilung der <i>Staphylococcus aureus</i> Keime durch den Analytischen-Profil-Index .....	29
Tabelle 5 Einteilung des Virulenzgrades der <i>S. aureus</i> Keime anhand der Überlebensrate der Gallerien.....	31
Tabelle 6: Zusammenstellung des PVL und $\alpha$ -Hämolysin -PCR- Reaktionsansatzes.....	35
Tabelle 7: Invasivität der <i>S. aureus</i> Stämme;.....	39
Tabelle 8: Einstufung der Virulenz der <i>S. aureus</i> Stämme;.....	43
Tabelle 9: Tabellarische Darstellung des PVL-PCR Ergebnis;.....	46
Tabelle 10: Tabellarische Darstellung des $\alpha$ -Hämolysin-PCR Ergebnis .....	48
Tabelle 11: Einteilung der Keimvirulenz von <i>S. aureus</i> ; .....	50
Tabelle 12: Einteilung der Keimvirulenz von <i>S. aureus</i> ; .....	50

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AFM	Atomkraftmikroskopie
Agr	Accessory gene regulator
Bap	Biofilm-associated protein
BHI	Brain-Heart-Infusion
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
Bspw.	beispielsweise
bzw	beziehungsweise
CA-MRSA	Community-acquired MRSA
CFU	Colony-forming-units
Cif	Clumping factor
CifA	Clumping factor A
CifB	Clumping factor B
CLSM	Konfokalmikroskop
Cn	Collagen
Cna	Collagen adhesin
CT	Computer-Tomographie
Ct	Schwellenzyklus
CRP	C reaktives Protein
CV	Kristal Violet
DMMA	Dimethylen Methyl Blau
DRG	Diagnose related Groups
eDNA	extrazellulär Desoxyribonucleotidacid
ESR	Erythrozytensedimentationsrate
EZM	Extrazelluläre Matrixmoleküle
FAK	Focal adhaesin kinase
Fib	Fibrinogen
FKS	Fetales Kalbserum
Fn	Fibronectin
FnBP	Fibronectin-binding protein
FnBR	Fibronectin-binding regions
Ggf.	gegebenenfalls
HA-MRSA	Hospital acquired MRSA

IABI	implant-associated bone infection
Isd	Iron-regulated surface protein
IrgAB	leucin rich $\alpha$ -2-glycoprotein AB
LukF-PV	Leukozidin-F-Panton-Valentin-Gen
LukS-PV	Leukozidin-S-Panton-Valentin-Gen
MEM	Minimales essentielles Medium
MOI	Multiplicity of infection
MSCRAMM	Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules
MSSA	Methicilin sensible staphylococcus aureus
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
MRSA	Methicilin resistente staphylococcus aureus
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
NaCl	NatriumChlorid
NEA	non essential aminoacids
NLRP3	nucleotide-binding domain + leucine-rich repeat containing proteins
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET-CT	Positronenemissionstomographie
PIA	Polysaccharide intracellular adhesin
Pls	Plasmid-sensitiv surface protein
PMMA	Polymethylmetaacrylat
PJI	Prosthetic joint infection
PTK	Protein tyrosin kinase
RPM	Rotation per minute
SAOS-2	Sarcoma osteogenetic 2
SasC	<i>S. aureus</i> surface protein C
SasG	<i>S. aureus</i> surface protein G
SCCmec	staphylococcal chromosomal cassette <i>mec</i>
Sdr	Serine-aspartat repeat protein
SERAM	Secretable expended repertoire adhesive molecules
Std.	Stunden
TSB	Tryptic soy broth
USD	United States Dollar
$\Delta R_n$	Zuwachs des Fluoreszenzsignals

## Publikationsverzeichnis

### Publikation

#### **Whole-genome comparison of high and low virulent *S. aureus* isolates which induced acute and chronic implant-associated bone infections**

Gopala Krishna Mannala<sup>#</sup>, Julian Koettnitz<sup>#</sup>, Walid Mohamed, Ursula Sommer, Katrin Lips, Cathrin Spröer, Boyke Bunk, Jörg Overmann, Torsten Hain, Christian Heiss, Eugen Domann, Volker Alt

Int J Med Microbiol. 2018 Jul;308(5):505-513.

<sup>#</sup>contributed equally to work

### Vortrag

#### **Virulenzbestimmung von *S. aureus* Keimen von Patienten mit Implantat-assoziierten Knocheninfektionen mittels in-vivo-, in-vitro- und Biofilm-untersuchungen im Vergleich zum klinischen Verlauf.**

Koettnitz J, Mohammed W, Tilp S, Heiß C, Chakraborty T, Domann E, Alt V  
Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2016). Berlin, 25.-28.10.2016.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Heiß, Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg für die Möglichkeit meine Promotionsarbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Dr. Alt danke ich für die Überlassung des Themas und seine jederzeit gewährte Unterstützung. Sein großes Interesse und persönliches Engagement waren für mich Hilfe und Motivation gleichermaßen.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Domann, stellvertretender Direktor des Instituts für medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, und seinen Mitarbeitern, wie Frau Zechel-Gran ohne deren mikrobiologisches Fachwissen diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank auch an Herrn Dr. Mohamed, Herrn Mannala für Ihre Expertise, Unterstützung im Versuchsaufbau und die stets freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ein weiterer Dank gilt nochmals Herrn Prof. Dr. Dr. Alt, Herrn Prof. Dr. Domann, Herrn Mannala, Herrn Dr. Mohamed für das Ermöglichen der Veröffentlichung einer Publikation dieser Thematik.

Ein besonderer Dank gilt meiner lieben Frau, die mich jederzeit tatkräftig unterstützte.